

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**ENSAYO DE TOLERANCIA A HERBICIDAS Y FERTILIZACIÓN EN *Populus sp.*  
PARA OBTENCIÓN DE BIOMASA**

presentado por

**JOAQUÍN LECUMBERRI ERRO (*e*)<sup>k</sup>**

*aurkeztua*

**INGENIERO AGRONOMO  
*NEKAZARITZA INGENIARITZA***

Febrero 2010

## MEMORIA

El cultivo de *Populus sp.* en corta rotación y alta densidad para obtención de biomasa se encuentra en fase de experimentación en España. Entre los objetivos que se plantean dentro del Plan Nacional de Energías Renovables está la generación de energía cuya fuente sea la biomasa, de la que mayor crecimiento espera.

En el Departamento de Ciencias del Medio Natural de la UPNA se esta trabajando desde hace dos años con *Populus sp.* en diferentes localizaciones dentro del programa Euroinnova. Este grupo de investigación está encargado de estudiar la respuesta de la fertilización nitrogenada.

Además, tras varios años de observación, se ha comprobado que la implantación del cultivo está supeditada a un buen control de las malas hierbas.

El presente trabajo final de carrera contiene dos estudios diferentes con diferentes objetivos: por un lado se pretende estudiar la respuesta fisiológica del *Populus sp.* a la fertilización nitrogenada con  $\text{NO}_3^-$ . Por otro lado se pretende conocer como afectan los diferentes herbicidas permitidos en el cultivo del chopo sobre el desarrollo del mismo.

Para la ejecución del proyecto se ha realizado un ensayo en la finca de prácticas de la UPNA y posteriormente se han analizado diferentes parámetros de crecimiento, actividades enzimáticas, deltas del nitrógeno, etc.



## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DEL TRABAJO PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. Pedro Aparicio Tejo y la Dra. Berta Lasa Larrea, como directores del Trabajo Fin de Carrera “Ensayo de herbicidas y fertilización en *Populus sp.* para obtención de biomasa”, realizado en el Departamento de Ciencias del Medio Natural por Joaquín Lecumberri Erro, autoriza la presentación del mismo ya que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Fdo. Berta Lasa Larrea

Fdo. Pedro Aparicio Tejo

Pamplona, a 8 de Febrero de 2010



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer el apoyo recibido a todas las personas que me han ayudado para la realización de este Trabajo Fin de Carrera. Por un lado a Pedro Aparicio y especialmente a Berta Lasa e Iván Jauregui. Muchas gracias por todas las horas dedicadas para la realización de este trabajo.

También quiero reconocer al resto de compañeros y familiares ajenos al proyecto que me han apoyado durante los años en los que he estado estudiando la carrera.

# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	1.1 CULTIVOS ENERGÉTICOS	3
	1.2 BIOMASA	3
	1.2.1 Formas en las que se presenta la biomasa	5
	1.2.2 Métodos de conversión y aplicaciones de la biomasa	6
	1.3 DESARROLLO ACTUAL DE LAS POLÍTICAS DE LA BIOMASA	9
	1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CHOPO	10
	1.4.1 Requerimientos edafoclimáticos	10
	1.5 POPULICULTURA	11
	1.5.1 Cultivo de chopo en turno corto y alta densidad (SRF)	11
	1.6 MATRIZ DAFO SOBRE CHOPO EN SRF EN ESPAÑA	17
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE CARRERA</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
	4.1 CONDICIONES DEL ENSAYO	29
	4.1.1 Descripción de las operaciones realizadas	29
	4.1.2 Datos climáticos	30
	4.1.3 Sustrato utilizado	33
	4.2 DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS	34
	4.2.1 Ensayo sobre tolerancia del <i>Populus sp.</i> a herbicidas	34
	4.2.1.1 Diseño experimental	37
	4.2.2 Ensayo de fertilización nitrogenada	38
	4.2.2.1 Diseño experimental	38
	4.3 MEDIDAS REALIZADAS	34
	4.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	39
	4.4.1 Glutamina sintetasa	40
	4.4.2 Nitrato reductasa	41
	4.5 CONTENIDO EN AMONIO	42
	4.6 ANÁLISIS DE DELTAS	42
	4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
5.1	ENSAYO DE HERBICIDAS	47
5.1.1	Medidas de crecimiento	48
5.1.1.1	Medidas de crecimiento en tratamientos con herbicida Glufosinato	48
5.1.1.2	Medidas de crecimiento en tratamientos de dosis recomendada para herbicidas Glifosato y Glufosinato	52
5.1.1.3	Medidas de crecimiento en tratamientos con herbicida Oxifluorfen	56
5.1.2	Actividad glutamina sintetasa (GS) y contenido en amonio en hojas	58
5.1.3	Datos SPAD en el ensayo de herbicidas	64
5.2	ENSAYO DE FERTILIZACIÓN	65
5.2.1	Medidas de crecimiento	65
5.2.2	Actividad nitrato reductasa <i>in vivo</i>	69
5.2.3	Datos SPAD de fertilizantes	70
5.2.4	Análisis de deltas de nitrógeno	71
5.2.5	Porcentaje de nitrógeno marcado	73
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXO ESTADÍSTICA</b>	<b>97</b>



## 1. INTRODUCCIÓN



## **1.1 CULTIVOS ENERGÉTICOS**

El actual modelo energético es insostenible, ya que hay dependencia de un recurso "no renovable" cada vez más escaso, el petróleo. Por ello, cada vez es mayor la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de energía, menos agresivas con el medio ambiente y que permitan implementar un programa eficaz y riguroso de eficiencia energética.

Para tal fin, las actuaciones se centralizan en el desarrollo de las energías renovables, entre las cuales se encuentra la biomasa como fuente de energía directa y que se puede utilizar tanto para pequeñas como para medianas demandas de calor, para la generación de electricidad y la producción de combustibles de automoción.

Los cultivos energéticos son plantaciones de crecimiento rápido que se realizan con el propósito específico de producir energía en alguna de sus tipologías: térmica, eléctrica o mediante su transformación en biocarburantes. Tienen como premisa la obtención, de forma rentable, de la máxima cantidad neta posible de energía, lo que significa que los balances de energía y económicos netos del producto deben ser positivos, utilizando la menor cantidad de inputs posibles.

La situación actual de los cultivos energéticos lignocelulósicos para la producción de energía es únicamente a escala demostrativa y prácticamente inexistente a escala comercial.

## **1.2 BIOMASA**

La Directiva 2003/30 (relativa al fomento del uso de biocarburantes en el transporte) y el Real Decreto 661/2007 (producción de energía eléctrica en régimen especial) definen biomasa como la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos procedentes de la agricultura (incluida las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las

industrias conexas, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales.

La biomasa es la principal fuente de energía para más de 2.000 millones de personas, siendo la principal fuente de energía en los países en vías de desarrollo.

En la siguiente figura se muestra la matriz energética mundial, observándose la dependencia de los combustibles fósiles:

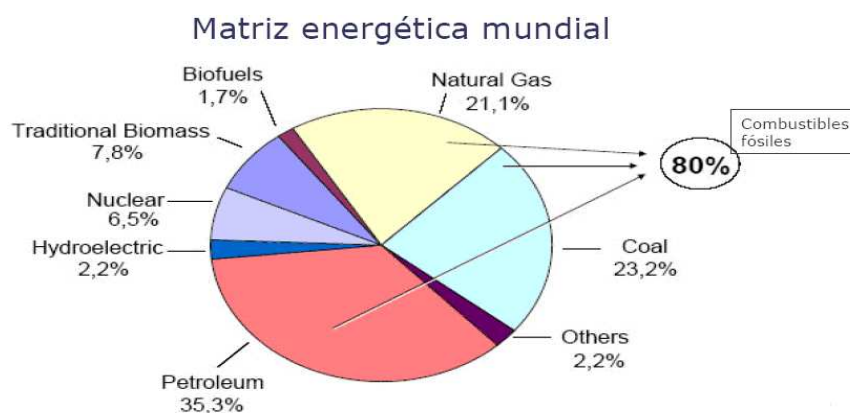


Figura 1: Matriz energética mundial. (International Energy Agency, 2006).

Los beneficios de la utilización de la biomasa son de tipo medioambiental, económico y social. Dentro de los beneficios medioambientales destacan el uso de energías renovables, reducción de emisiones de CO<sub>2</sub>, cumplimiento del protocolo de Kyoto y la limpieza de montes para prevenir incendios. Dentro de los beneficios económicos están la diversificación de las fuentes de energía, reducción de la dependencia energética de otros países así como generación de empleo. Dentro del beneficio social están el desarrollo de nuevas zonas rurales.

La biomasa, como fuente de energía ofrece una serie de ventajas:

- El aprovechamiento energético puede convertir un residuo agrícola en un recurso para obtención de energía
- Es un importante campo de innovación tecnológica
- La producción de biomasa está totalmente descentralizada

- Analizando las fluctuaciones de precios en la agricultura, los cultivos energéticos pueden sustituir progresivamente a los cultivos excedentarios
- Disminuye la dependencia externa de combustibles fósiles

Aunque también tiene una serie de desventajas:

- El rendimiento de las calderas de biomasa es inferior a las que usan combustible fósil, requiriéndose mayor cantidad de biomasa para conseguir la misma cantidad de energía; 2 kg de pellets de madera al 10% humedad por kg de gasóleo (Artese y col., 2002).
- Los canales de distribución de la biomasa están prácticamente sin desarrollar
- Hay gran dispersión espacial de la biomasa
- Hay gran variabilidad y estacionalidad de la producción
- La competencia del aprovechamiento energético de la biomasa con otros fines puede ocasionar incertidumbres de abastecimiento y oscilación de precios de las materias primas
- La necesidad de grandes espacios y una planificación adecuada para poder automatizar las operaciones

### 1.2.1 FORMAS EN LAS QUE SE PRESENTA LA BIOMASA

Se presenta de las siguientes formas:

- Natural: Se produce espontáneamente en la naturaleza. La intervención humana comienza en su control o recogida. Este es el caso de los restos de las podas forestales
- Residual seca: Se origina como subproducto de las actividades agrícolas, forestales, de los procesos de la industria agroalimentaria o de la transformación de la madera
  - ✓ Agrícola
    - Herbáceos (paja del cereal, zuro y cañote del maíz, residuos de girasol, paja de arroz)
    - Leñosos (sarmientos, restos de poda de frutales)

- ✓ Forestal
  - De cortas finales de explotaciones forestales
  - De tratamiento silvícola de masa forestales
  - Leñas
- ✓ Industrial
  - Industria agroalimentaria (cáscara de almendra, orujillo)
  - Transformación de la madera (serrín)
- Residual húmeda: Vertidos biodegradables como aguas residuales, residuos ganaderos, purines
- Cultivos energéticos: Tienen la finalidad de producir biomasa para obtener biocombustibles así como generación de calor y electricidad (Fernández J., 2008)
  - ✓ Oleaginosos (colza, girasol, soja)
  - ✓ Alcohólicos (cereales, caña de azúcar, maíz, sorgo)
  - ✓ Lignocelulósicos (chopos, sauces)

### 1.2.2 MÉTODOS DE CONVERSIÓN Y APLICACIONES DE LA BIOMASA

A continuación se presentan los procesos de conversión de biomasa más relevantes, los cuales se pueden clasificar en tres categorías:

- Procesos de combustión directa
- Procesos bioquímicos
- Procesos termoquímicos

#### Proceso de combustión directa

Los sistemas de combustión directa son aplicados para generar calor, el cual puede ser utilizado para la cocción de alimentos, secado de productos agrícolas así como para la producción de vapor en procesos industriales. Las tecnologías de combustión directa van desde simples estufas y calderas hasta otros más avanzados como combustión de lecho fluidizado. En los últimos años han apareciendo nuevos equipos más eficientes, abriendo una oportunidad para los productos densificados de biomasa como briquetas y pellets.

## Procesos bioquímicos

Estos procesos utilizan las características bioquímicas de la biomasa y la acción metabólica de organismos para producir combustibles gaseosos y líquidos. Son más apropiados para la conversión de biomasa húmeda que los procesos termo-químicos. Los más importantes son:

- **Digestión anaeróbica:** la digestión de biomasa por bacterias en un ambiente sin oxígeno produce un gas combustible denominado biogás. En el proceso, se introduce la biomasa en un digestor cerrado y allí se deja fermentar, produciéndose el gas, que es mezcla de metano y dióxido de carbono. La materia remanente dentro del digestor es un fertilizante orgánico.
- **Biodiesel y bioetanol:** el biodiesel se compone de ácidos grasos y ésteres alcalinos obtenidos de aceites vegetales, grasa animal y grasas recicladas. A partir de un proceso llamado “transesterificación”, los aceites derivados orgánicamente se combinan con alcohol (etanol o metanol) y se alteran químicamente para formar ésteres grasos. Estos pueden ser mezclados con diesel o usados directamente como combustibles en motores.
- **Aprovechamiento de metano de vertederos:** la fermentación de los residuos produce metano.

## Procesos termoquímicos

En general los procesos termoquímicos se caracterizan porque no requieren de la acción de microorganismos para transformar las materias primas, trabajando a altas temperaturas y con la acción de catalizadores para potenciar las reacciones químicas. Estos procesos aportan la ventaja de poder emplear un amplio rango de materias primas, de forma que cualquier material con

contenido en carbono puede ser transformado mediante procesos termoquímicos.

La ruta termoquímica se divide habitualmente en dos fases fundamentales, una primera etapa de transformación de la biomasa en un producto intermedio (gas de síntesis) y una segunda etapa de transformación del producto intermedio en los productos deseados. Otro proceso termoquímico es la producción de carbón vegetal.

- **Gasificación:** es la transformación inicial de biomasa en gas de síntesis. El proceso se desarrolla a temperatura entre 800 y 1400 °C con una mayor proporción de oxígeno, en el que la biomasa se transforma en una mezcla de gases, fundamentalmente hidrógeno, metano y monóxido de carbono. El gas de síntesis (también llamado gas pobre) generado a partir de la biomasa, tras ser acondicionado apropiadamente, es transformado por catalizadores metálicos. Estos catalizadores convierten el hidrógeno y monóxido de carbono presentes en el gas de síntesis en una mezcla de alcoholes, en la que el producto mayoritario es etanol. Además se sintetizan otros productos como alcoholes superiores y oxigenados. Se puede aplicar el etanol en equipos convencionales como en motores de combustión interna.
- **Producción de carbón vegetal:** en este proceso la biomasa se quema con una disponibilidad restringida de aire, lo cual impide que la combustión sea completa. El residuo sólido se usa como carbón vegetal, el cual tiene mayor densidad energética que la biomasa original, no produce humo y es ideal para uso doméstico.



### **1.3 DESARROLLO ACTUAL DE LAS POLÍTICAS DE LA BIOMASA**

Los propósitos de la política energética de la Comisión Europea son la competitividad, sostenibilidad y la seguridad de suministro. Se pretende reducir la demanda energética, incrementar la confianza en las fuentes de energía renovables, diversificar las fuentes de energía renovables y promover la cooperación internacional.

Los cultivos energéticos son uno de los principales medios para el impulso de la producción energética a partir de fuentes renovables a corto y medio plazo en los países de la Unión Europea.

Dentro de los objetivos del Plan de Energías Renovables (PER) para el periodo 2005-2010 están que la energía producida por la biomasa sea de 1317 MW, siendo producidos a fecha de Marzo de 2009 solamente 417 MW, por lo que solo se ha cumplido el 32 % del objetivo (Turmo J., 2009).

Sin embargo, el desarrollo ha sido distinto en función del tipo de cultivo. Por un lado, los cultivos dedicados a la producción de biocarburantes se han desarrollado bien, ya que son cultivos en los que el agricultor generalmente conoce su manejo. Por otro lado, los cultivos energéticos lignocelulósicos apenas se han implantado, ya que o son nuevas especies o bien especies cuyo manejo del cultivo es diferente al tradicional, estando actualmente en fase de experimentación.

Para ayudar en la implantación de estas nuevas fuentes de energía se publicó el Real Decreto 661/2007, que establece el marco legal de producción de electricidad y energía térmica procedente de la biomasa, y amplía las expectativas económicas de todos los eslabones de la cadena de valor de la biomasa como fuente de energía. De esta forma se incrementa la tarifa para la electricidad producida por la biomasa.

## **1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CHOPO**

El chopo es un árbol esbelto, de porte cilíndrico, que puede alcanzar gran talla. Su tronco es recto, con la corteza inicialmente lisa de color gris verdoso que posteriormente se va oscureciendo y agrietando. Tiene ramas casi fastigiadas (paralelas al tronco). Sus hojas son simples, alternas y caedizas, de contorno triangular con bordes de forma variable. Su pecíolo es largo, dándole movilidad a la hoja. Tiene flores masculinas y femeninas dispuestas en árboles separados (dioicos). El fruto es capsular y sus semillas están recubiertas con un penacho algodonoso que favorece su diseminación por el viento.

El género *Populus sp.* pertenece a la familia botánica de las *Salicaceae*, que a su vez comprende unas 30 especies con amplia distribución natural. Dispone de gran amplitud ecológica y variación genética, características que posibilitan su mejora genética. Esta familia botánica tiene preferencia por los hábitats húmedos, las llanuras inundables y las riberas fluviales.

### **1.4.1 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS**

El chopo se adapta a una gran diversidad climática siempre que disponga de agua. La temperatura óptima de crecimiento está entre 15-25 °C, siendo limitantes las inferiores a 5-10° C y las superiores a 30- 40 °C.

En cuanto a la altitud, en España vegeta desde el nivel del mar hasta los 1.000 metros de altura, gracias a la fuerte insolación y al clima, generalmente templado. Se adaptan bien a muchos tipos de suelos, si éstos no son extremadamente arcillosos, ácidos o salinos, prefiriendo suelos de textura tipo franca a franco-arenosa o franca-limosa. El chopo no se considera una especie exigente en nutrientes y gracias a esto puede encontrarse en suelos de regadío que son pobres para el cultivo agrícola, aunque un suelo fértil favorece su desarrollo. El chopo crece satisfactoriamente en un rango amplio de suelos y pH, siendo 6,5 su pH óptimo.

## **1.5 POPULICULTURA**

La superficie plantada de chopo va en ligero aumento en España durante los últimos años, debido principalmente a su rentabilidad, a la demanda de madera de chopo de calidad y al abandono de tierras agrarias. La superficie ocupada con plantaciones de chopos en el año 2008 es de aproximadamente 135.710 ha, localizándose el 60% de esta superficie en Castilla y León (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Comisión Nacional del Chopo, 2008)

En Navarra, la superficie de chopo asciende a 3.135 ha, distribuidas en numerosos recintos localizados en parcelas próximas a los cauces de los ríos. Destacan los existentes en los términos de Funes, Milagro, Marcilla y Villafranca. Además de las plantaciones mencionadas, también se encuentran choperas naturales en las riberas de los ríos que pasan por Navarra como el Ebro, Arga y Aragón.

### **1.5.1 CULTIVO DE CHOPO EN TURNO CORTO Y ALTA DENSIDAD (SRF)**

Los cultivos forestales de turno corto y alta densidad (Short Rotation Forestry ó SRF en terminología anglosajona; a partir de este momento diremos SRF) consisten en plantaciones para la producción de biomasa de especies seleccionadas principalmente por su precocidad, rapidez de crecimiento y capacidad de rebrote tras el corte y se caracterizan por la alta densidad de plantación y sus reducidos tiempos de corta respecto al cultivo tradicional.

El chopo tiene varias características que hacen que sea adecuado para utilizarlo como cultivo energético. Entre estas se encuentran un alto poder energético y calidad como combustible, crecimiento juvenil rápido, elevada y constante producción de brotes, resistencia frente a enfermedades foliares, buena cicatrización de los cortes de explotación anual, capacidad de crecer en plantaciones densas así como abundante follaje (Sixto y col., 2007).

Puesto que se trata de un cultivo energético, en la medida de lo posible se empleará la menor cantidad de inputs posible para intentar obtener el mayor retorno económico. Aunque las necesidades de riego para este cultivo son bajas respecto a otros, es necesario utilizar material vegetal eficiente en el uso del agua.

### **Experimentación:**

A nivel internacional, las primeras reseñas sobre producción de biomasa leñosa en SRF aparecieron a principios del año 1970. En España el interés comenzó a finales de esa misma década, iniciándose los primeros ensayos con chopo. En torno a 1985 se inició en el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER) de Soria un programa de investigación con varios objetivos, entre ellos determinar la producción, densidad de plantación, turno de corta, técnicas de implantación, manejo del cultivo y selección de clones. Actualmente la investigación continua y hay iniciados varios programas de demostración a nivel nacional, como el “Euroinnova Navarra” y el “Proyecto On-Cultivos”.

### **Técnicas de cultivo**

La multiplicación del chopo se realiza normalmente por medio de estaquillas cultivadas en vivero, siendo de una longitud de 25 cm y un grosor de 10 mm aproximadamente. La implantación de las mismas puede hacerse en el comienzo del otoño o entre el final del invierno y el comienzo de la primavera, dependiendo en cada caso de las condiciones climáticas de la zona. Se utilizan marcos con separaciones incluso inferiores a un metro, lo que supone densidades que superan las 10.000 plantas/ha.

Para llevar a cabo la plantación es necesario realizar una buena preparación del suelo, pues debe quedar en condiciones óptimas para realizar la plantación y promover un adecuado desarrollo del sistema radicular.

Después del primer año de crecimiento, existe la opción de realizar la operación de recepe, que consiste en eliminar la parte aérea al final del primer

periodo de crecimiento y su misión es favorecer el desarrollo de las yemas latentes situadas en la base del tallo, formando una especie de cepa, a partir de la cual crezcan con mayor vigor un mayor número de brotes. Después se realiza la corta, que se realiza en turnos de entre dos y cinco años en la época de parada vegetativa. Se estima que la vida de la plantación puede ser superior a 15 años, pudiéndose realizar 8 o más ciclos de corta en cada plantación.

## **Fertilización**

El grado de fertilidad del suelo condiciona de manera importante la producción en biomasa, ya que constituye el principal suministro de nutrientes para la planta.

Existe controversia sobre la práctica de fertilizar o no fertilizar las plantaciones de chopo en SRF, ya que no se conoce bien si los efectos producidos son significativos. La asociación italiana para la biomasa “Itabia” recomienda, en función de las características locales, de incorporar fertilizantes antes del establecimiento de la plantación y siempre mediante la utilización de compuestos que no acarreen riesgos medioambientales. Además se sugiere la conveniencia de repetir la fertilización tras la corta y antes de que se produzca la nueva brotación en cada ciclo de cultivo.

Se considera que los aportes del desfronde al final del periodo vegetativo pueden contribuir a la recirculación de nutrientes, debido a que el contenido acumulado en las hojas es comparativamente superior al acumulado en el fuste de los árboles. No obstante, en cualquier momento del cultivo se pueden presentar síntomas de deficiencias en algún nutriente que es preciso analizar para su posterior corrección.

A la fertilización tradicional, se unen en los últimos años los estudios en los que se analiza la posibilidad de utilizar una fertilización alternativa a través del empleo de aguas residuales, lodos procedentes de granjas, etc., habiéndose obtenido resultados positivos en la mejora de la productividad de las plantaciones. En cualquier caso, conseguir una alta eficacia en la aplicación de

fertilización aconsejará realizar una evaluación del lugar, así como considerar el efecto que pueden provocar otros tratamientos aplicados.

Hay que tener en cuenta que la aplicación de fertilización puede acarrear un coste energético que debe ser valorado, tanto desde el punto de vista financiero como medioambiental. Asimismo, en el plano energético, es de gran interés optimizar la utilización de labores y fertilizantes, ya que gran parte de los insumos energéticos utilizados en la producción de la biomasa puede atribuirse a los tratamientos culturales aplicados, especialmente a los tratamientos de fertilización.

### **Tratamientos herbicidas**

El control de la vegetación herbácea en la instalación de plantaciones de chopo a partir de estaquillas es una práctica imprescindible para su adecuado desarrollo. Esta vegetación impide que la plantación se desarrolle correctamente durante su primer año de cultivo aumentando su crecimiento, al reducir la disponibilidad de agua y nutrientes. Además, se establece una intensa competencia con las estaquillas por el espacio y por la luz hasta que el chopo no adquiere un porte adecuado.

Después de cada recolección, la falta de cubierta vegetal podría permitir el desarrollo de las malas hierbas. En este momento, es necesario evaluar la competencia que puede establecerse entre el cultivo y las malas hierbas para ver si compensa realizar un control fitosanitario.

## Producción

El rendimiento obtenido en una plantación depende de una gran cantidad de factores, entre los que cabe destacar el turno de corta, la densidad de plantación, clima, tipo de suelo, clon elegido, presencia de plagas o enfermedades y las técnicas de cultivo empleadas.

Los resultados alcanzados a nivel internacional son prometedores. Aunque hay referencias de que las producciones pueden pasar de 20 t m.s./ha y año (Christersson, 2006), por otro lado, otro investigador cifra la producción media de biomasa entre 12 y 15 t m.s./ha y año (El Bassam, 1998).

En resumen, con la experiencia que actualmente se tiene, a mayor turno de corta y mayor densidad de plantación, mayor productividad si bien, a partir de cierta densidad (20.000-30.000 plantas/ha) y de forma muy relacionada con la fertilidad del suelo, es posible que aparezcan competencias entre plantas y el aumento no sea significativo. Hay claras diferencias entre clones, por lo que debe elegirse el material vegetal que mejor se adapte a las condiciones climáticas de cada zona de cultivo. La densidad y el turno de corta se deben fijar en función del crecimiento posible en cada zona y la maquinaria disponible, sobre todo para la recolección.

## Caracterización de la biomasa de chopo y aplicaciones energéticas

Cuando se pretende realizar un aprovechamiento energético de la biomasa es necesario conocer sus características químico-energéticas. Los valores medios de la composición química de la biomasa más significativos expresados en porcentaje sobre biomasa seca son (Ciria M.P., 2009):

- cenizas 2%
- volátiles 80%
- carbono 50%
- hidrógeno 6%
- nitrógeno <1%

- azufre <0,1%
- oxígeno 41%.
- contenido energético: poder calorífico superior (PCS) 20 MJ/kg de biomasa seca (humedad 0%)
- poder calorífico inferior (PCI) 18,5 MJ/kg de biomasa seca (humedad 0%).

La biomasa de chopo se emplea básicamente como combustible sólido en calderas y otros equipos de combustión. Además, tiene un bajo nivel de emisiones y baja tendencia a la sinterización, repercutiendo ello en un buen funcionamiento y bajo mantenimiento de estos equipos.

### **Balance energético del chopo**

Un balance de energía es una suma de entradas y salidas de insumos y productos necesarias para producir un producto.

Las entradas o inputs son las energías primarias utilizadas, como el combustible de tractores y máquinas que laborean la tierra, plantan, realizan tratamientos fertilizantes y fitosanitarios, recolectan y transportan la cosecha. También se tiene en cuenta las energías secundarias, procedentes del uso de las materias primas y de los materiales. Es el caso de los fertilizantes, fitosanitarios, estaquillas, agua de riego y de los propios tractores y máquinas en sí mismos. Las salidas u outputs corresponden al valor energético de la cosecha, del cultivo producido y comercializado (Lasa y col., 2010).

El balance energético de un cultivo consiste en relacionar las entradas con las salidas de energía, expresadas en las mismas unidades. Los balances energéticos pueden expresarse bien en valores absolutos de energía neta ganada o perdida, procedente de la diferencia entre entradas y salidas de energía, expresada normalmente en megajulios por hectárea (MJ/ha), o en valores relativos, como eficiencia energética del cultivo, procedente del cociente entre salidas y entradas (IDAE, 2007).



## **1.6 MATRIZ DAFO SOBRE CHOPO EN SRF EN ESPAÑA**

Para analizar las características del cultivo de chopo en SRF se ha realizado el siguiente análisis DAFO (Debilidades, Amenazas, Fortalezas y Oportunidades) para tener una idea cercana acerca de los puntos fuertes y débiles de este cultivo.

<b>FORTALEZAS</b>	<b>DEBILIDADES</b>
Cultivo renovable	Manejo del cultivo
Posibilidad de implantación en zonas no aptas para otros cultivos	Problemática de malas hierbas y fertilización
Bajo nivel de inputs	Desconfianza
	Rentabilidad menor a otros cultivos
<b>OPORTUNIDADES</b>	<b>AMENAZAS</b>
Cultivo en desarrollo	“Ética” de producir un producto no alimentario
Campo de innovación tecnológica	Visión de combustible “sucio”
	Rentabilidad menor a otros cultivos

Tabla 1: Matriz DAFO

### **FORTALEZAS:**

- Cultivo renovable: Los cultivos SRF son una fuente de energía renovable.
- Posibilidad de implantación en diversas zonas agroclimática: El chopo puede ser plantado en multitud de zonas.
- Bajo nivel de inputs: En principio, el chopo tiene unos requerimientos de nutrientes y de laboreo menor a otros cultivos.

## **OPORTUNIDADES:**

- Cultivo en desarrollo: Los cultivos energéticos y particularmente los SRF están aún en fase de experimentación, aunque hay ensayos realizados con buenos resultados productivos.
- Campo de innovación tecnológica: Esta mejorando la eficiencia de las calderas de biomasa.

## **DEBILIDADES:**

- Manejo del cultivo: Los cultivos SRF apenas se conocen y los agricultores no tienen experiencia con el mismo.
- Problemática de malas hierbas y fertilización: Solo se conocen resultados de experimentaciones y no de explotaciones agrícolas.
- Desconfianza: El hecho del escaso desarrollo de la biomasa como fuente de energía y especialmente los cultivos SRF hacen que haya cierta susceptibilidad en el sector.
- Rentabilidad menor a otros cultivos: En principio, parece más rentable producir un cultivo alimentario, pero con el desarrollo de este mercado la rentabilidad puede variar.

## **AMENAZAS:**

- “Ética” de producir un producto no alimentario: El hecho de producir algo que no va a tener como destino la alimentación puede ser negativo especialmente desde el punto de vista de la sociedad.
- Visión de combustible “sucio”: El destino del chopo es mayoritariamente como combustible para calderas de pellets, y puede verse como un combustible “sucio”, ya que deja cenizas y puede ser incómodo, comparado con el gasóleo.
- Rentabilidad menor a otros cultivos: En principio, parece más rentable producir un cultivo alimentario, pero con el desarrollo de este mercado la rentabilidad puede variar.

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE CARRERA



Como se ha comentado anteriormente, la presencia de malas hierbas se considera como uno de los factores críticos en el establecimiento de las nuevas plantas de chopo durante el primer año de permanencia de la planta, pudiendo llegar a ser un factor limitante que impida el correcto establecimiento de la plantación o que comprometa seriamente su desarrollo vegetativo. Las labores mecánicas pueden dañar la planta joven, no debiendo realizarse en la zona próxima al árbol, lo que obliga a recurrir a una escarda manual, cada día menos disponible y más costosa. Debido a las elevadas densidades de plantación utilizadas generalmente no se pueden realizar laboreos después del primer año, por lo que dichos laboreos se darán antes de este primer año o incorporados al agua de riego en el caso de que se disponga de sistema de riego (Sixto y col., 2002).

Las materias activas con acción herbicida autorizadas para ser utilizadas en España son solamente tres: Oxifluorfen, Glifosato y Glufosinato amónico (Sixto y col., 2007).

El presente trabajo pretende incrementar los conocimientos disponibles sobre el efecto de los herbicidas Oxifluorfen (herbicida de preemergencia), Glufosinato amónico (herbicida de contacto con cierta acción sistémica), y Glifosato (herbicida de postemergencia) sobre las plantas de chopo durante el primer año de crecimiento, así como de su eficacia en el control de las malas hierbas bajo distintas condiciones de ensayo.

Se estudia el Oxifluorfen aplicado en una sola dosis y en momento de preemergencia a su dosis recomendada (DR). Se analiza el efecto del Glufosinato aplicado en tres dosis (dosis recomendada, dosis mitad a la recomendada y dosis doble a la recomendada) y en tres momentos (1, 2 y 3 meses tras plantación). Se trabaja con las otras dos dosis distintas a la recomendada teniendo en cuenta criterios agronómicos y situaciones que pueden darse en campo: la dosis mitad de la recomendada es una “dosis de deriva”, que puede darse por un mala aplicación del herbicida con la campana, y la dosis doble puede darse por una mala aplicación del herbicida por una

pasada doble por la planta o ante situaciones de grave infestación de malas hierbas.

Por último, se estudia el efecto del Glifosato a su dosis recomendada (DR) en tres momentos (1, 2 y 3 meses tras plantación).

Además, se pretende estudiar la respuesta fisiológica del *Populus sp.* a la fertilización nitrogenada. Para tratar de ajustar la dosis de fertilizante óptima se estudian dos dosis, la dosis recomendada (60 kg N-NO<sub>3</sub>) y dosis doble a la recomendada (120 kg N-NO<sub>3</sub>) aplicados en tres momentos tras la plantación.

### 3. OBJETIVOS





Los objetivos del presente trabajo final de carrera son:

- Estudiar el efecto del modo de aplicación y del momento de aplicación de los herbicidas autorizados en el cultivo de *Populus sp.* en corta rotación y alta densidad durante el primer año de crecimiento.
- Estudiar la dosis de fertilizante nitrogenado en forma de nitrato y el momento de aplicación del fertilizante para un óptimo aprovechamiento del nitrógeno por el cultivo de *Populus sp.* en corta rotación y alta densidad durante el primer año de crecimiento.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## **4.1 CONDICIONES DEL ENSAYO**

El material vegetal utilizado ha sido estaquillas de chopo. Se ha utilizado el clon I-214 (*Populus x euroamericana*), que es el predominante en más del 70 % de las plantaciones de choperas de España, con buenos resultados en general, siendo utilizado en los terrenos de fertilidad media. No obstante, se puede mejorar la calidad y producción de madera con otros clones, de forma que se implanten los más adaptados a la condición de suelo existente en cada lugar.

### **4.1.1 DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES REALIZADAS**

Comienza el día 22 de mayo de 2009 en la finca de prácticas del Sario de la Universidad Pública de Navarra y se ubica concretamente en un invernadero multicapilla. Ese día se realiza el mezclado en una hormigonera eléctrica de tierra y perlita en una proporción 1:1 pasando la mezcla posteriormente a macetas. Las macetas tienen una capacidad de 35 litros y un radio de 40 cm y llevan también platos para no perder el agua sobrante. Se colocan 2 goteros a cada maceta, que tienen un caudal de 4 l/h por maceta.

El lunes 25 de mayo se efectúa la plantación de estaquillas y se da un riego por goteo durante tres horas antes de plantar. En el momento de la plantación la tierra estaba húmeda y las estaquillas habían sido conservadas en frigoríficos a una Tª de 2 °C y una humedad relativa alta. En los instantes previos a la plantación se realiza la aplicación del tratamiento herbicida de Oxifluorfen mediante una pistola a presión. Del total de estacas que había para plantar, se seleccionan las más homogéneas posibles. A continuación se ha aplicado un riego de 7 minutos al día.

El lunes 15 de junio se realizan los tratamientos de herbicida de Glufosinato amónico en el momento I, al mes de crecimiento a DR/2, DR y DRx2 así como el tratamiento de Glifosato a DR mediante la aplicación con pistola pulverizadora. Además se efectúa el tratamiento a dosis de 60 kg N-NO<sub>3</sub> y 120 kg N-NO<sub>3</sub> del ensayo de fertilización. Después se puso perlita en la parte superior de la tierra para evitar evaporación de agua.

El jueves 16 de Julio se realizan los tratamientos de herbicida de Glufosinato amónico en el momento II, a los dos meses de crecimiento a DR/2, DR y DRx2 así como el tratamiento de Glifosato a DR. También se realizan los tratamientos a los dos meses a dosis de 60 kg N-NO<sub>3</sub> y 120 kg N-NO<sub>3</sub> del ensayo de fertilización siguiendo la misma metodología que en el momento I.

El miércoles 12 de Agosto se realizan los tratamientos de herbicida con Glufosinato amónico en el momento III, a los 3 meses de crecimiento a DR/2, DR y DRx2 así como el tratamiento de Glifosato a DR. También se realizan los tratamientos a dosis de 60 kg N-NO<sub>3</sub> y 120 kg N-NO<sub>3</sub> del ensayo de fertilización siguiendo la misma metodología que en los momentos I y II.

#### 4.1.2 DATOS CLIMÁTICOS

A continuación se exponen los datos climáticos obtenidos de la estación meteorológica de la UPNA para los diferentes momentos de aplicación de los tratamientos. Se muestran las temperaturas medias, máximas y mínimas en periodos que van desde el día de aplicación del tratamiento de preemergencia hasta 1 mes más tarde del último tratamiento.

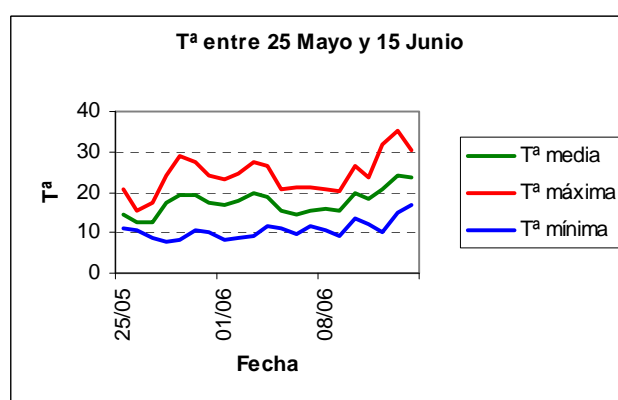


Figura 2: Datos climáticos en el periodo 25 Mayo- 15 Junio

En este espacio de tiempo (25 Mayo-15 Junio) la Tª media se situó entre 15 y 20 °C y apenas se superaron los 30 °C de Tª máxima.

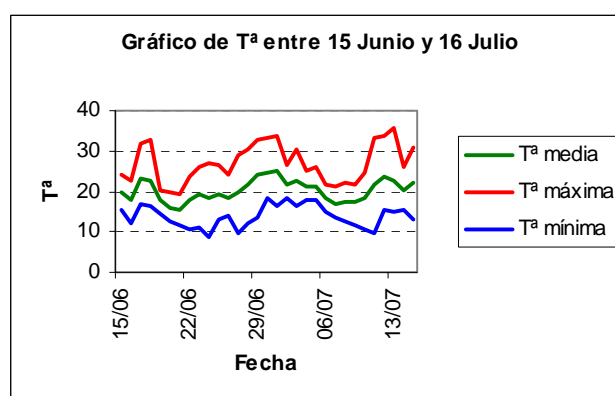


Figura 3: Datos climáticos en el periodo 15 Junio- 16 Julio

En este periodo de tiempo (15 Junio –16 Julio) la Tª media se situó en torno a 20 °C y se superaron durante varios días los 30 °C de Tª máxima.

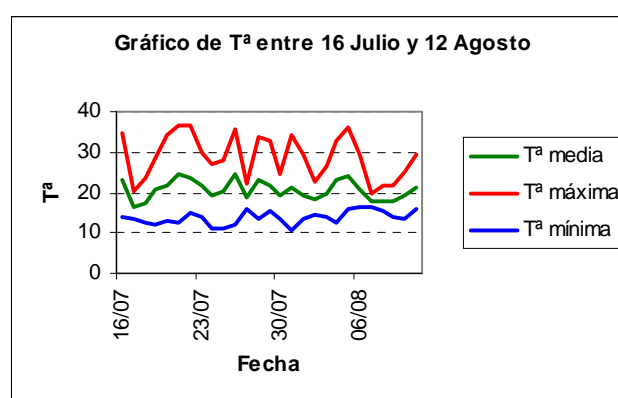


Figura 4: Datos climáticos en el periodo 16 Julio- 12 Agosto

En este espacio de tiempo (16 Julio –12 Agosto) la Tª media se fue superior a los 20 °C y se superaron durante bastantes días los 30 °C de Tª máxima, llegando en varios de ellos a rebasar los 35 °C.

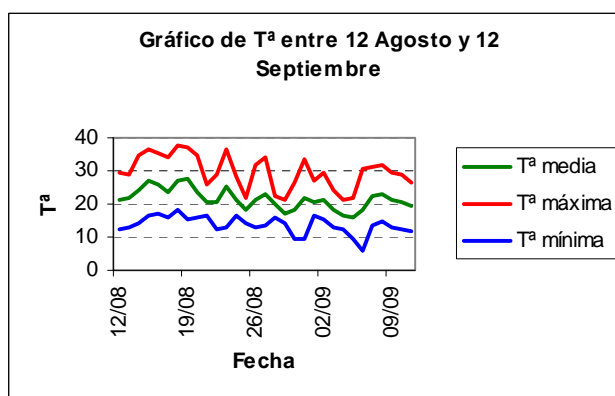


Figura 5: Datos climáticos en el periodo 12 Agosto- 12 Septiembre

En este periodo de tiempo (12 Agosto –12 Septiembre) la Tª media fue en torno a los 20 °C y se superaron durante bastantes días los 30 °C de Tª máxima, llegando en varios de ellos a rebasar los 35 °C.

### 4.1.3 SUSTRATO UTILIZADO

Como se ha comentado anteriormente, el sustrato utilizado era una mezcla 1:1 de suelo y perlita. Se ha realizado el análisis NMIN al suelo, tomando 5 g de suelo al que se añaden 40 ml de KCl (1M) y se agita, posteriormente se centrifuga y en el sobrenadante se determina el contenido de amonio y nitrato. El nitrato y amonio en los extractos se determinaron colorimétricamente mediante un autocalizador Brant Luebbe.

El valor de NMIN obtenido es 177 kg N/ha. Resulta un valor alto, pero es necesario tener en cuenta que el sustrato utilizado es una mezcla 1:1 de suelo y perlita, con lo cual el N mineral disponible es menor. La perlita se añade para conferir características al sustrato como aireación y mayor capacidad de retención de agua.

En la figura 6 vemos valores de NMIN a través de análisis de suelos en los horizontes 0-30 y 30-60 cm en parcelas de cereal de distintas zonas de Navarra durante 5 años.

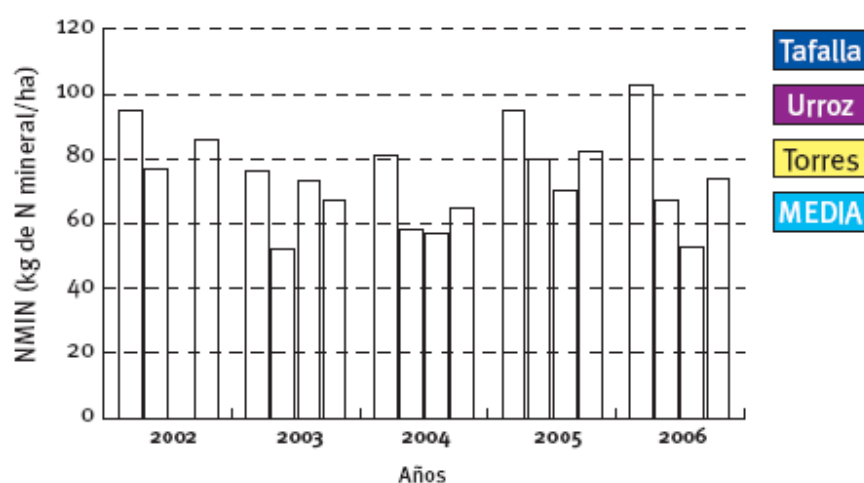


Figura 6: Datos de nitrógeno mineral en un ensayo de Navarra. (IDAE, 2007)

El análisis NMIN de suelo es variable a lo largo del tiempo y es necesario conocer la capacidad de mineralización de nitrógeno a lo largo del ciclo del cultivo.



## **4.2 DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS**

Se plantean 2 ensayos con diferentes objetivos: un ensayo de tolerancia a herbicidas y otro de fertilización nitrogenada.

### **4.2.1 ENSAYO SOBRE TOLERANCIA DEL *POPULUS SP.* A HERBICIDAS**

Como se comenta en la justificación del proyecto, las materias activas permitidas para el chopo y autorizadas en España son Oxifluorfen, Glufosinato amónico y Glifosato.

El Oxifluorfen empleado es un herbicida con el nº 13.005 en el registro de productos fitosanitarios y tiene el nombre comercial de “Febo”. Es un herbicida con acción residual. Es absorbido por las hojas actuando sobre los tejidos meristemáticos foliares. El ámbito de utilización es variado y va desde cultivos hortícolas, semilleros, viveros hasta plantaciones forestales para el control de malas hierbas anuales en pre o post-emergencia precoz. Para las frondosas se recomienda una dosis entre 2 y 4 l/ha, por lo que para el tratamiento que vamos a realizar se ha elegido una dosis recomendada de 3 l/ha.

El Glufosinato amónico empleado es un herbicida con el nº 18.770 en el registro de productos fitosanitarios y tiene el nombre comercial de “Finale”. Es un herbicida de contacto con un limitado efecto sistémico. El producto es absorbido por las hojas y en mejor medida por los tallos verdes. No se absorbe por los tallos cuya corteza está suberificada ni tampoco por las raíces. Actúa inhibiendo la formación de la enzima glutamina sintetasa, provocando una concentración excesiva de amonio en la planta que resulta letal para ella. El ámbito de utilización es variado para el control de malas hierbas anuales y vivaces en especies leñosas, plantaciones agrícolas, plantaciones forestales, cercas y linderos en post-emergencia. Para el control de malas hierbas anuales de todas las especies vegetales se recomienda una dosis de entre 5 y 10 l/ha, para el tratamiento que vamos a realizar se ha elegido una dosis recomendada de 5 l/ha. Además, como se ha comentado anteriormente se realizan dos tratamientos de dosis mitad a la recomendada (DR/2) y dosis doble a la recomendada (DRx2) que se aplican 1, 2 y 3 meses tras la plantación.

El Glifosato empleado es un herbicida con el nº 24.201 en el registro de productos fitosanitarios y tiene el nombre comercial de “Super Sting”. La acción herbicida del Glifosato se debe a la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), usados en la síntesis de proteínas y que son esenciales para el crecimiento y supervivencia de la mayoría de las plantas. El Glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa.

El ámbito de utilización es variado para el control de malas hierbas anuales y vivaces en redes viarias y de servicio, plantaciones forestales, cercas, linderos y pastizales en post-emergencia. Para el control de malas hierbas anuales de todas las especies vegetales se recomienda una dosis entre 1,5 y 6 l/ha, por lo que para el tratamiento que vamos a realizar se ha elegido una dosis recomendada de 1,5 l/ha. La dosis de este tratamiento recomendado se repite en tres momentos de aplicación. Por ello, el tratamiento de Glifosato tiene una única dosis de 1,5 l/ha que se aplica 1, 2 y 3 meses tras la plantación.

En resumen, en el ensayo de herbicida se plantea un único tratamiento de preemergencia (Oxifluorfen) y varios tratamientos de postemergencia (Glufosinato amónico y Glifosato). El Glufosinato amónico se plantea en tres momentos diferentes y en tres dosis distintas, mientras que el Glifosato en tres momentos diferentes a la misma dosis.

Tabla del ensayo de herbicida:

<b>Momento y dosis</b>	<b>Herbicida (materia activa)</b>	<b>Riqueza</b>	<b>Dosis (L/ha)</b>	<b>Volumen aplicado (μL/maceta)</b>	<b>Fecha de aplicación</b>
Control	No se aplica	-	-	-	-
M1 DR/2	Glufosinato amónico	15%	2,5	31,4 μ/10ml	15 de Junio
M1 DR	Glufosinato amónico	15%	5	62,8 μ/10ml	15 de Junio
M1 DRx2	Glufosinato amónico	15%	10	125,6 μ/10ml	15 de Junio
M2 DR/2	Glufosinato amónico	15%	2,5	31,4 μ/10ml	16 de Julio
M2 DR	Glufosinato amónico	15%	5	62,8 μ/10ml	16 de Julio
M2 DRx2	Glufosinato amónico	15%	10	125,6 μ/10ml	16 de Julio
M3 DR/2	Glufosinato amónico	15%	2,5	31,4 μ/10ml	12 de Agosto
M3 DR	Glufosinato amónico	15%	5	62,8 μ/10ml	12 de Agosto
M3 DRx2	Glufosinato amónico	15%	10	125,6 μ/10ml	12 de Agosto
Preemergencia DR	Oxifluorfen	24%	3	37,68 μ/10ml	25 de Mayo
M1 DR	Glifosato	24%	1,5	18,84 μ/10ml	15 de Junio
M2 DR	Glifosato	24%	1,5	18,84 μ/10ml	16 de Julio
M3 DR	Glifosato	24%	1,5	18,84 μ/10ml	12 de Agosto

Tabla 2: Ensayo de herbicida

#### **4.2.1.1 Diseño experimental**

Se dispuso de 70 macetas de 35 litros, y una vez brotadas se seleccionaron 56 macetas en las que las estaquillas tuviesen un crecimiento homogéneo para ser utilizadas en el ensayo. Los diferentes tratamientos fueron distribuidos en el invernadero siguiendo un diseño de bloques al azar (4 repeticiones de cada tratamiento).

## 4.2.2 ENSAYO DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA

En el ensayo sobre fertilización nitrogenada se utiliza  $^{15}\text{N}$  para ver el aprovechamiento de nitrógeno por parte de la planta. Se utiliza un 1% del nitrógeno marcado sobre la dosis de nitrato aportado. Se plantean dos dosis diferentes en tres momentos de aplicación. Lógicamente para ambos ensayos se cuenta con plantas control (sin ningún tipo de tratamiento).

Tratamientos del ensayo de fertilización:

Tratamiento	Dosis de N (kg/ha)	Peso aplicado $\text{KNO}_3$ (g/maceta)	Peso aplicado $\text{KNO}_3$ marcado (g/maceta)	Peso total $\text{KNO}_3$ (g/maceta)	Fecha de aplicación
Control	-	-	-	-	
M1 DR	60	26,911	0,272	27,183	15 de Junio
M1 DRx2	120	53,823	0,544	54,367	15 de Junio
M2 DR	60	26,911	0,272	27,183	16 de Julio
M2 DRx2	120	53,823	0,544	54,367	16 de Julio
M3 DR	60	26,911	0,272	27,183	12 de Agosto
M3 DRx2	120	53,823	0,544	54,367	12 de Agosto

Tabla 3: Ensayo de fertilizante

### 4.2.2.1 Diseño experimental

Se dispuso de 30 macetas de 35 litros, y una vez brotadas se seleccionaron 28 macetas en las que las estaquillas tuviesen un crecimiento homogéneo para ser utilizadas en el ensayo. Los diferentes tratamientos fueron distribuidos en el invernadero siguiendo un diseño de bloques al azar (4 repeticiones de cada tratamiento).

### **4.3 MEDIDAS REALIZADAS**

Se han efectuado varias medidas durante el desarrollo del ensayo así como durante la finalización del mismo. Se han realizado medidas de crecimiento como determinación del peso fresco de los tallos, relación peso fresco/peso seco, área foliar y SLA (Specific Leaf Area ó Área foliar específica), así como determinación de valores SPAD. También se han realizado determinaciones enzimáticas como actividad glutamina sintetasa y actividad nitrato reductasa. Otras medidas realizadas han sido contenido en amonio de hojas, contenido isotópico en N y porcentaje de  $^{15}\text{N}$  incorporado.

Las medidas de crecimiento se realizaron para ambos ensayos. La determinación enzimática de actividad GS y contenido en amonio solamente para las plantas tratadas con Glufosinato amónico. Las determinaciones enzimáticas de actividad nitrato reductasa y contenido isotópico en N solo se realizaron para el ensayo de fertilización.

Para la realización de las medidas de crecimiento, de cada maceta se separaron hojas, tallo y raíz. Se tomaron los datos de peso fresco de tallos tras ser cortados, mientras que los datos de peso seco de tallos se obtuvieron tras permanecer en una estufa de circulación de aire a 70 °C durante 48 horas. Como se verá en el apartado “Resultados”, se produjeron varias marras y por ello, al analizar los parámetros pf/ps y SLA solo se tienen en cuenta datos de plantas vivas, mientras que para el dato de peso fresco las marras toman el valor de cero.

Para determinar el área foliar se ha empleado el LICOR LI- 3000 A. Consta de un escáner y un lector y trabaja midiendo el contorno de la muestra contabilizando las rectas cubiertas por área foliar.

El índice SLA se expresa en unidades de  $\text{m}^2/\text{kg}$  peso seco de hoja. Es una unidad de medida que indica la superficie foliar que ocupa un kg de materia seca foliar.

El valor de SPAD en hojas se ha medido con el aparato SPAD-502. La cantidad de clorofila sirve como indicador de las condiciones nutricionales en las que se halla la

planta. El hecho de no tener mucha clorofila produce una disminución en la tasa de fotosíntesis y consecuente bajada en la producción.

#### **4.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS**

Se han realizado determinaciones enzimáticas en muestras de hojas, que fueron almacenadas a -80 °C, previamente congeladas con nitrógeno líquido.

##### **4.4.1 GLUTAMINA SINTETASA**

Para la extracción se toman 0,2 g de peso fresco de hoja y se pulveriza la muestra con nitrógeno líquido en el mortero. Se añaden 2 ml (1+1) de tampón de extracción y se homogeneiza la muestra. Tras homogeneizarlo, se filtra por miracloth y se recoge el sobrenadante en un tubo de plástico y se mantiene en hielo hasta centrifugación, que se realiza a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Después se recoge el sobrenadante en un tubo de cristal y se mantiene en hielo.

Se ponen 100 µl de extracto con 300 µl de tampón de reacción en tubos de plástico. Se prepara un blanco con 100 µl de agua destilada con 300 µl de tampón de reacción y se incuba 20 minutos a 35 °C y se para la reacción con 1 ml de solución STOP.

Por último se centrifuga a 4.500 rpm durante 5 minutos y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Este dato se aplica en la siguiente

$$\text{fórmula: } \mu\text{molGHM} / \text{gPF} * \text{min} = \frac{\text{abs540nm} * 1,4 * \text{vol.extracción}}{0,439 * 0,1 * \text{gPF} * 20 \text{ min}}$$

##### **Datos de los diferentes tampones y soluciones de este protocolo:**

Tampón de extracción: 50 mM TRIS-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol. Se añade en fresco 5 mM DTE, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,6 % PVPP y 1 mM cisteína.

Tampón de reacción (con pH 7,8): 100 mM Tricina, 10 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NH<sub>2</sub>OH. Se añade en fresco 8 mM ATP y 80 mM Glutamato.

La solución STOP: FeCl<sub>3</sub> 100 g/l + 56 ml/l HCl 35% + 326 ml/l ácido tricloroacético 10%.

#### 4.4.2 NITRATO REDUCTASA

La actividad nitrato reductasa se midió en hojas en el momento III de aplicación de nitrato, concretamente una semana después a realizar dicha aplicación.

Para la extracción se pesan 0,25 g de hojas y se hacen tiras de igual anchura con el bisturí. Se añaden 5 ml de tampón de reacción a tubos, introduciendo la muestra tras echar el tampón con ayuda de unas pinzas y tratando de que se hunda. Se ponen los tubos en hielo. Para medir la actividad máxima de la enzima se añade a los 5 ml de tampón 250 µl de solución 1 M de  $\text{KNO}_3$ . Para medir la actividad real se echa solo el tampón. Se ponen los tubos al vacío dos veces a 400 mm Hg durante 10 minutos en hielo y se hace dos veces para recolocar las tiras de material que hayan aflorado a la superficie.

El ensayo se incuba a 30 °C durante 60 minutos en agitación y oscuridad. La determinación del nitrito se hace quitando el material vegetal por volcado y apartando con pinzas los trozos que puedan quedar. Se toman 0,5 ml de extracto y se añade: 0,5 ml de sulfanilamida y 0,5 de NEDA y se agita. Se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Se hace una recta 0-60 µM de  $\text{KNO}_2$  a partir de una madre de 50 mM de  $\text{KNO}_2$  y el resultado de la absorbancia se aplica en la recta patrón.

Datos de los diferentes tampones y soluciones de este protocolo:

Tampón de reacción (pH 7,5): 100 mM tampón fosfato, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 1 % propanol.

Reactivos: 1 % Sulfanilamida en 1,5 N de HCl, 0,1 % NEDA.



#### **4.5 CONTENIDO EN AMONIO**

Se toma una muestra de 0,1 g de hoja y se introduce en un eppendorf, se le añade 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se hierve durante 5 minutos en agitación. Se centrifuga durante 10 minutos a 2500 g y se extrae el sobrenadante en el cual se determina el contenido de amonio mediante un autoanalizador Brant Luebbe.

#### **4.6 ANÁLISIS DE DELTAS**

Las muestras de material vegetal (hojas, tallos y raíz) de todos los tratamientos fueron desecadas a 80 °C durante 48 horas y posteriormente molidas. Los valores  $\delta^{15}\text{N}$  se determinan en sub-muestras de 1 mg de peso seco, depositados en cápsulas de estaño e introducidas en un analizador elemental NC 2500 (CE Instruments, Milan, Italia) donde mediante una combustión Dumas las muestras se oxidaron dando lugar a una mezcla de gases. Los gases N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> fueron detectados por conductividad térmica. Como estándar del contenido total de C y N se utilizó acetanilida. La relación  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  fue analizada por un espectrómetro de masas (plus, Thermoquest, Finnigan). El valor de  $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  se define como:

$$\delta \text{ (‰)} = [(R_m/R_{\text{std}})-1]*1000$$

Donde:  $R_m = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  de la muestra  
 $R_{\text{std}} = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  del estándar

Con los datos del delta de N se calcula el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  incorporado en la planta mediante una fórmula matemática que deriva de la fórmula anterior.

#### **4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos con Oxifluorfen, actividad GS, contenido de amonio, actividad Nreductasa se analizaron con análisis de varianza ANOVA de una vía. Los datos de crecimiento de los tratamientos con herbicidas Glufosinato amónico y Glifosato, así como los del ensayo de fertilización se analizaron con ANOVA de doble vía, siendo el nivel de significación del 95% para ambos análisis.

## 5. RESULTADOS



## **5.1 ENSAYO DE HERBICIDAS**

Como se ha comentado anteriormente, en el ensayo de herbicidas se han empleado 3 herbicidas diferentes (Glufosinato, Glifosato y Oxifluorfen).

Para el Glufosinato, la dosis recomendada es de 5 l/ha. Además, para tratar de ajustar la dosis se han realizado ensayos con tratamientos de dosis doble a la recomendada (DRx2) y dosis mitad a la recomendada (DR/2), denominada también dosis de deriva. Para determinar el momento más adecuado de aplicación se han elegido tres momentos de aplicación (1,2 y 3 meses tras la plantación), debido a que los meses posteriores a la implantación son críticos para el desarrollo del chopo. Pasado ese tiempo el chopo adquiere ya un porte y la competencia con malas hierbas es menor.

Para el Glifosato, la dosis recomendada es de 1,5 l/ha. En este caso se ha determinado una única dosis que se repite en tres momentos de aplicación (1,2 y 3 meses tras la plantación).

En el caso del Oxifluorfen, la dosis recomendada es de 3 l/ha. Se trata de un herbicida de preemergencia que se aplica justo antes de la plantación.

Dentro de este ensayo, se han realizado varias medidas. Entre estas se incluyen medidas de crecimiento en todos los tratamientos así como actividad GS y contenido en amonio en los tratamientos de plantas tratadas con Glufosinato.

En el ensayo se produjeron varias marras de plantas debido a los tratamientos aplicados. Como se ha comentado, había 4 plantas por tratamiento. En el momento I perecieron 3 plantas de Glufosinato DR/2, 3 plantas de Glufosinato DR, así como las 4 plantas de Glufosinato DRx2. En el momento II perecieron 3 plantas de Glufosinato DRx2. Respecto a la aplicación de Glifosato, en el momento I perecieron 2 plantas y en el resto de momentos no hubo marras.

### 5.1.1 MEDIDAS DE CRECIMIENTO

Los parámetros de crecimiento analizados han sido el peso fresco de los tallos, relación peso fresco/peso seco de los tallos, área foliar e índice SLA y los resultados se explican a continuación. Al analizar los parámetros pf/ps y SLA solo se tienen en cuenta datos de plantas vivas. Para el dato de peso fresco y área foliar, las marras toman el valor de cero.

#### 5.1.1.1 Medidas de crecimiento en tratamientos con herbicida Glufosinato

En las siguientes gráficas se muestran las medidas de crecimiento de plantas tratadas con diferentes tratamientos de Glufosinato y plantas control.

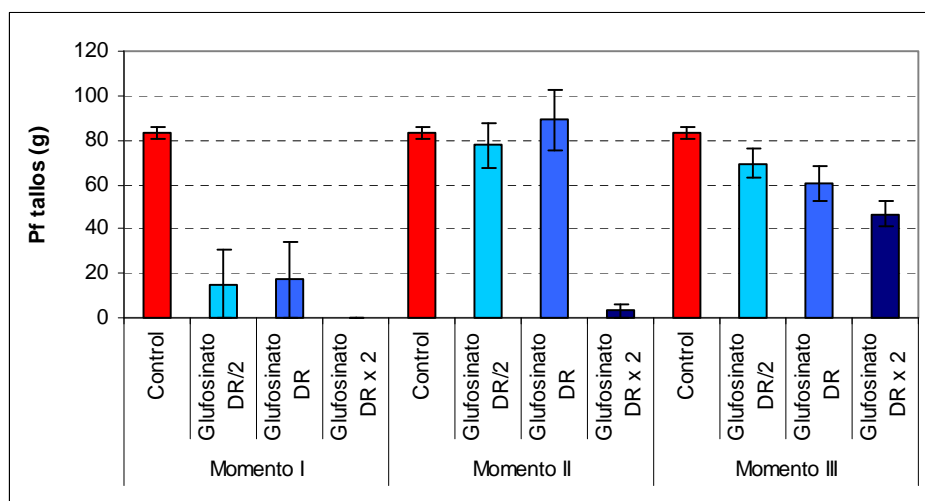


Figura 7: Peso fresco de tallos de las plantas crecidas con distintas dosis de Glufosinato aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 7 muestra el peso fresco de los tallos del ensayo de herbicidas tratados con distintas dosis de Glufosinato aplicadas en tres momentos diferentes. Se dan diferencias estadísticamente significativas en la interacción entre las variables momento y dosis. Al analizar la gráfica se ve que en el momento III al aumentar la dosis disminuye el peso fresco. En el momento I y II hay disminución de peso fresco de los tallos solo para la DRx2. Para los tres momentos, la DRx2 supone la mayor reducción del peso fresco de los tallos.

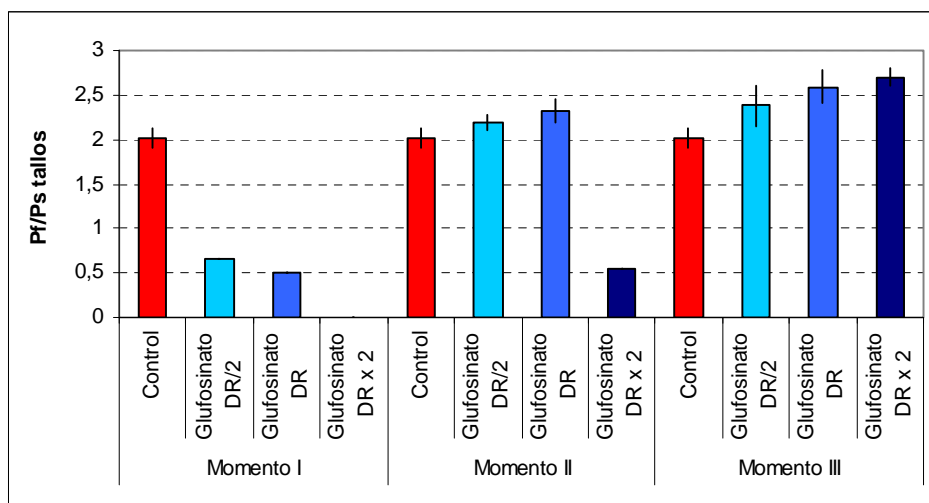


Figura 8: Relación entre el peso fresco y el peso seco de tallos de las plantas crecidas con distintas dosis de Glufosinato aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= número de plantas vivas en cada tratamiento). Ver anexo 1

La figura 8 muestra la relación entre el peso fresco y el peso seco de los tallos de las plantas que han sobrevivido tratadas con distintas dosis de Glufosinato en tres momentos diferentes. No hay interacción significativa entre la dosis y el momento de aplicación y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dosis estudiadas. La aplicación de herbicidas muestra una tendencia de aumentar esta relación, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. El momento de aplicación muestra que las plantas tratadas al mes de plantación tienen menor relación peso fresco/peso seco que las tratadas en otros momentos.

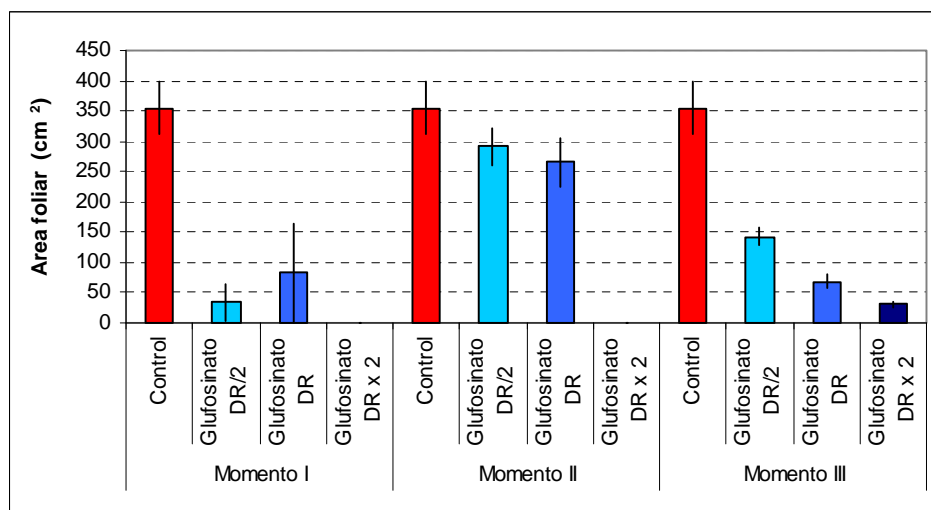


Figura 9: Área foliar de las plantas crecidas con distintas dosis de Glufosinato aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). Ver anexo 1

La figura 9 muestra el área foliar de las hojas del ensayo de herbicidas tratados con distintas dosis de Glufosinato en diferentes momentos. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la interacción de dosis y momento de aplicación. En el momento II y III al aumentar la dosis disminuye el área foliar. En el momento II únicamente la dosis de herbicida DRx2 afecta negativamente al área foliar.



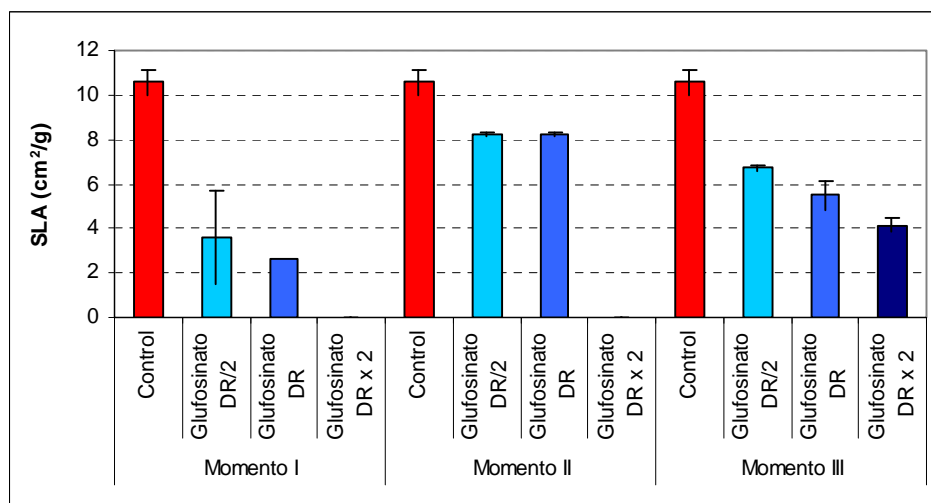


Figura 10: Índice SLA de las plantas crecidas con distintas dosis de Glufosinato aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= número de plantas vivas en cada tratamiento). Ver anexo 1

La figura 10 muestra el índice SLA del ensayo de herbicidas tratados con distintas dosis de Glufosinato en diferentes momentos. Se produce una interacción significativa entre dosis y momento. Se observa una tendencia a disminuir el SLA al aumentar la dosis siendo más patente esta reducción en el momento I.

### **5.1.1.2 Medidas de crecimiento en tratamientos de dosis recomendada para herbicidas Glufosinato y Glifosato**

En las siguientes gráficas se muestran las medidas de crecimiento de plantas tratadas con Glufosinato y Glifosato a sus dosis recomendadas comparadas con plantas control.

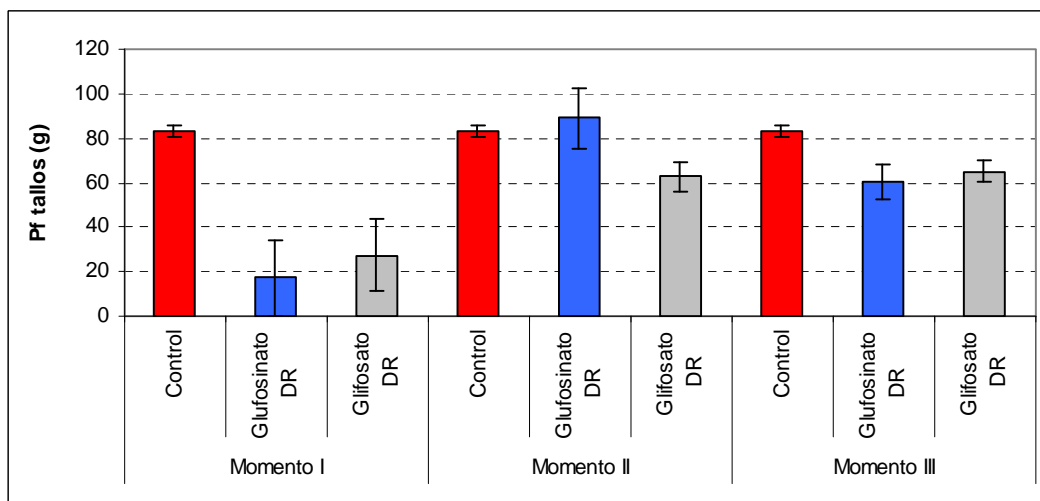


Figura 11: Peso fresco de tallos de las plantas crecidas con la dosis recomendada de Glufosinato y Glifosato en tres momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). Ver anexo 1

La figura 11 muestra el peso fresco de los tallos del ensayo de herbicidas tratados con la DR de Glufosinato y la DR de Glifosato comparados con las plantas control. No hay interacción significativa entre la variable momento de aplicación y la variable herbicida. Se dan diferencias estadísticamente significativas entre los momentos de aplicación pero no se dan diferencias significativas respecto a los herbicidas. En el momento I la aplicación de herbicidas produce plantas con el menor peso fresco mientras que para el momento II se dan las plantas con el peso fresco más alto. En el momento III ambos tratamientos producen similar peso fresco. Se puede observar que el tratamiento herbicida DR Glifosato produce similar peso fresco aplicado en el momento II que en el momento III.

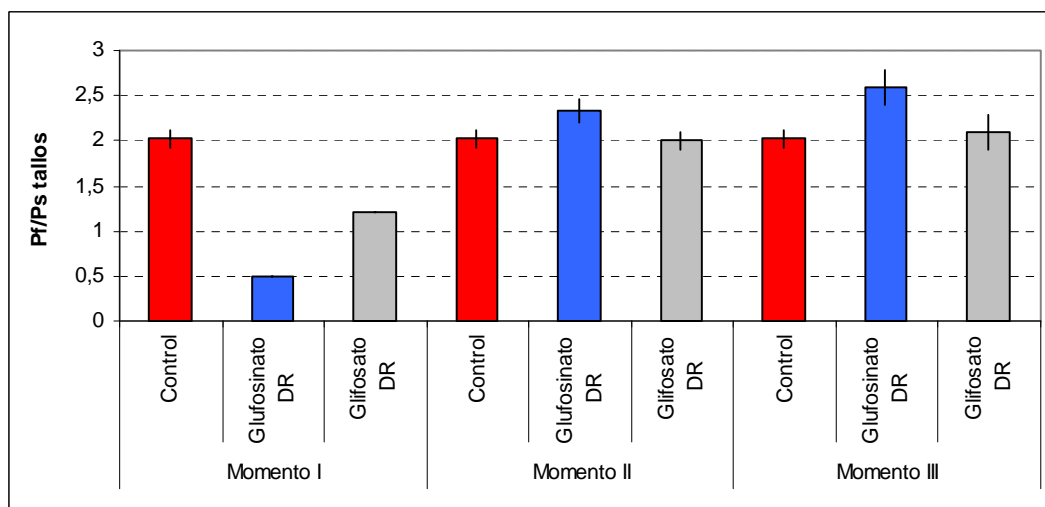


Figura 12: Relación entre el peso fresco y el peso seco de tallos de las plantas crecidas con la dosis recomendada de Glufosinato y Glifosato en tres momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= número de plantas vivas en cada tratamiento). Ver anexo 1

La figura 12 muestra la relación entre el peso fresco y el peso seco del ensayo de herbicidas tratados con la DR de Glufosinato y la DR de Glifosato. No hay interacción entre el momento de aplicación y el herbicida utilizado. Además, no hay diferencias significativas para estas variables entre el tipo de herbicida, pero sí entre momentos de aplicación. Se observa que en el momento I, la aplicación de herbicidas genera una relación peso fresco/peso seco menor que en el momento II y III.

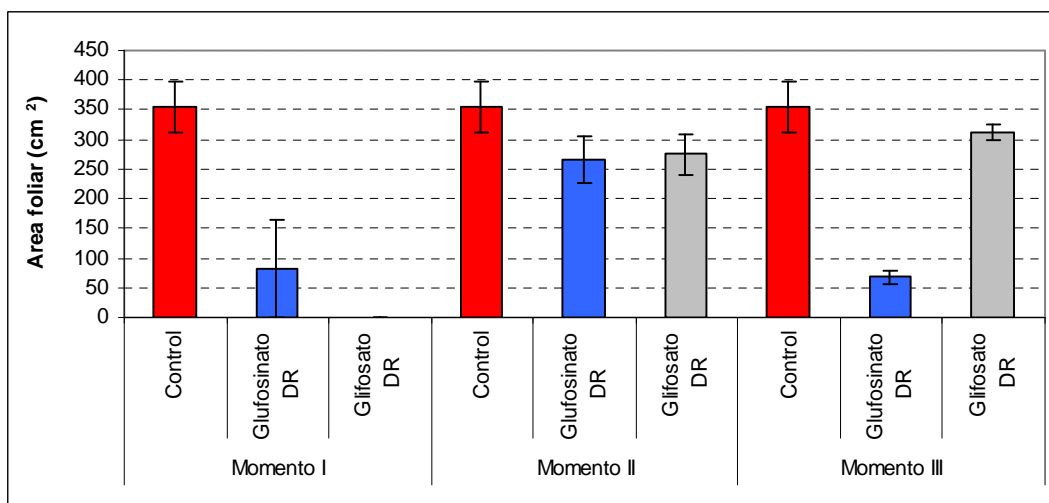


Figura 13: Área foliar de las plantas crecidas con la dosis recomendada de glufosinato y Glifosato en tres momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 13 muestra el área foliar del ensayo de herbicidas tratados con la DR de Glufosinato y la DR de Glifosato. Hay interacción significativa entre las variables momento de aplicación y herbicida. En el análisis de la figura podemos observar que el área foliar en el momento I es muy inferior a los demás momentos. La aplicación de diferentes herbicidas no supone diferencias en el área foliar para el momento II, pero si para el momento III, generando un descenso importante en este parámetro la aplicación de Glufosinato. El área foliar de las plantas tratadas con Glifosato es similar en los momentos II y III.

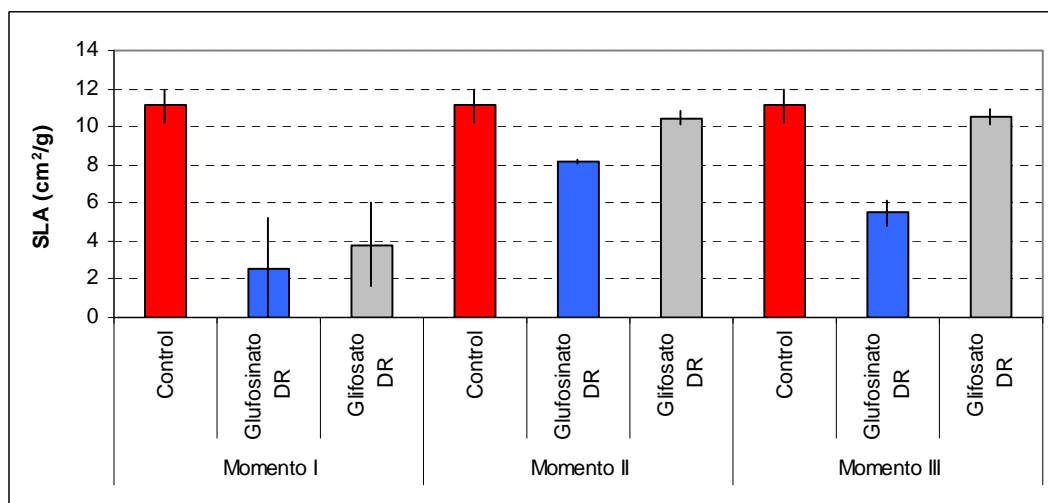


Figura 14: Índice SLA de las plantas crecidas con la dosis recomendada de Glufosinato y Glifosato en tres momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar ( $n$ = número de plantas vivas en cada tratamiento). Ver anexo 1

La figura 14 muestra el índice SLA del ensayo de herbicidas tratados con la DR de Glufosinato y la DR de Glifosato. No se produce una interacción significativa entre herbicidas utilizados y momento de aplicación. Sin embargo para ambas variables existen diferencias significativas. El índice SLA disminuye con la aplicación de Glufosinato, siendo menos afectado en el momento II. En cambio, la aplicación de Glifosato DR se ve menos afectada cuanto más tarde se aplica este herbicida, momento II y III.

### 5.1.1.3 Medidas de crecimiento en tratamientos con herbicida Oxifluorfen

En las siguientes gráficas se muestran las medidas de crecimiento de plantas tratadas con Oxifluorfen comparadas con plantas control.

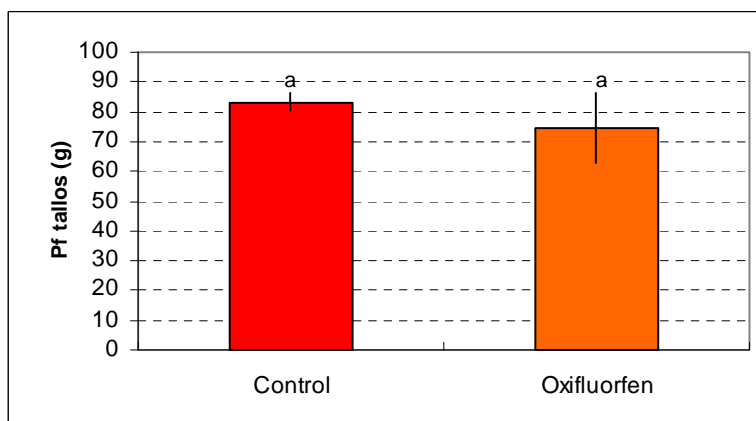


Figura 15: Peso fresco de tallos de las plantas control y tratadas con Oxifluorfen. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).

La figura 15 muestra el peso fresco de los tallos del tratamiento control respecto al tratamiento de preemergencia, Oxifluorfen. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación del herbicida y el control.

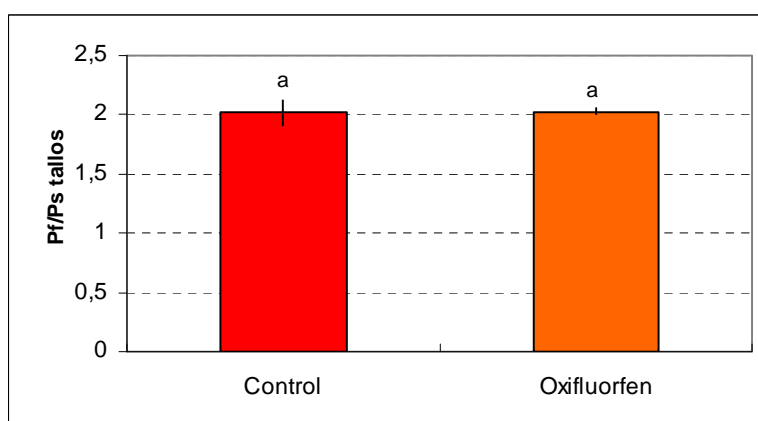


Figura 16: Relación entre peso fresco y peso seco de tallos de plantas control y tratadas con Oxifluorfen. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).

La figura 16 muestra la relación peso fresco / peso seco del control y Oxifluorfen. No se dan diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación del herbicida y el control.

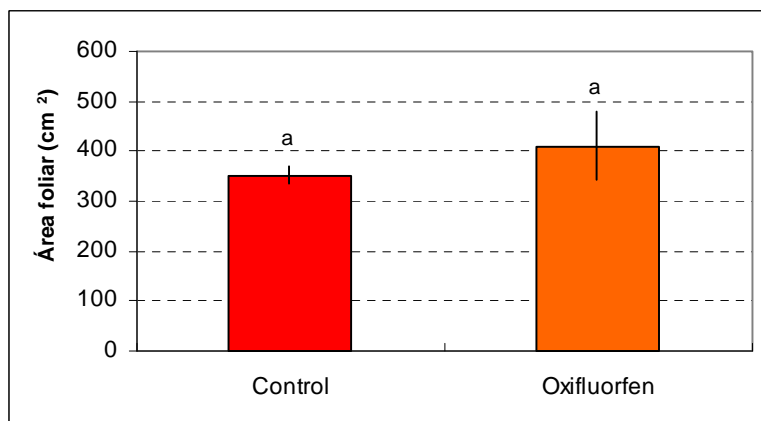


Figura 17: Área foliar de las plantas control y tratadas con Oxifluorfen. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).

La figura 17 muestra la el área foliar de los tratamientos control y Oxifluorfen. No se dan diferencias significativas entre la aplicación del herbicida y el control.

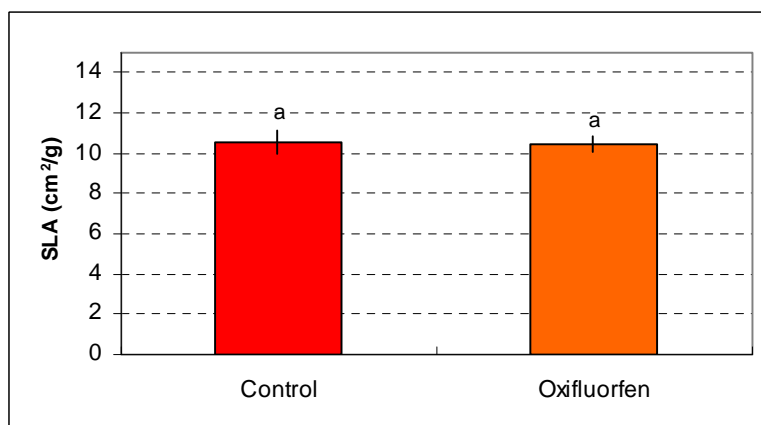


Figura 18: Índice SLA de las plantas control y tratadas con Oxifluorfen. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).

La figura 18 muestra el índice SLA entre el control y Oxifluorfen. No se dan diferencias significativas entre la aplicación del herbicida y el control.

### 5.1.2 ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA (GS) Y CONTENIDO EN AMONIO EN HOJAS

A continuación se muestra la figura de actividad GS y contenido en amonio en hojas medido sobre las plantas a 24 horas y 7 días después de la aplicación de Glufosinato en el momento I (al mes de crecimiento). No se hizo análisis a los 15 días ya que las plantas se encontraban prácticamente sin hojas.

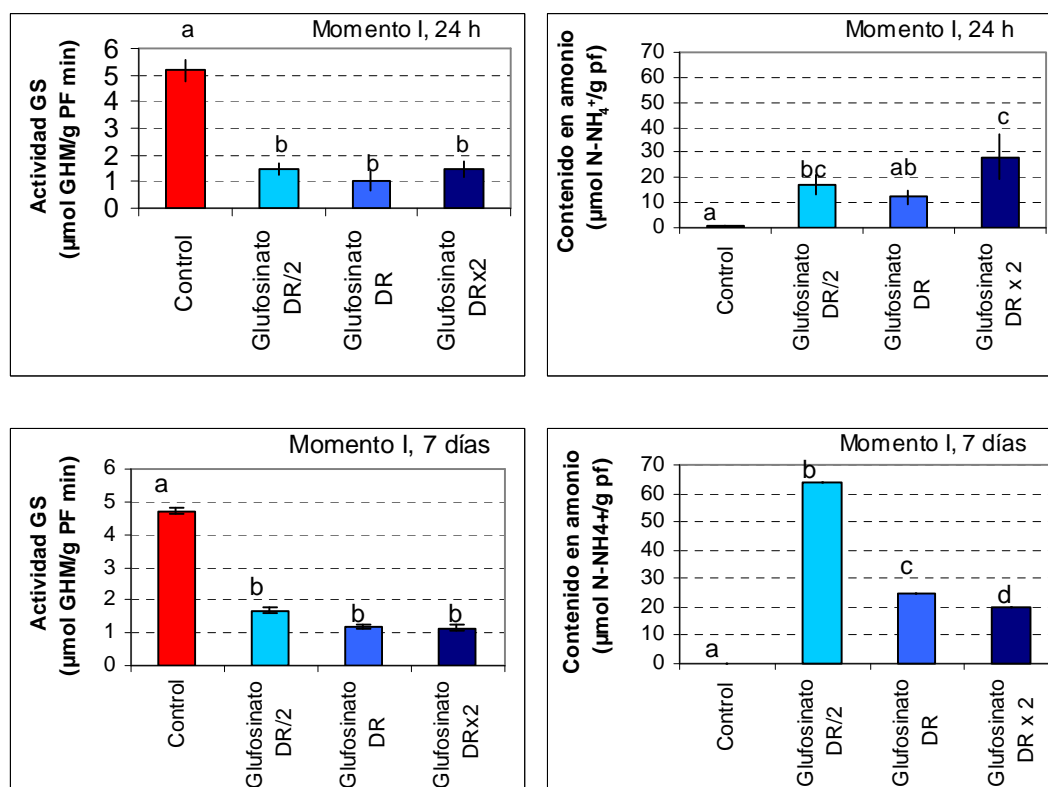


Figura 19: Actividad GS y contenido en amonio medidos en hojas a las 24 horas y 7 días de aplicación de las diferentes dosis de Glufosinato amónico al mes de crecimiento. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ).

Se dan diferencias estadísticamente significativas en la actividad GS y en el contenido en amonio tanto a las 24 horas como a los 7 días de la aplicación del herbicida.

La actividad GS disminuye en torno a un 70% al aplicar el Glufosinato respecto



del control independientemente de la dosis de herbicida utilizado.

Respecto al contenido en amonio en hojas, tanto a las 24 horas como a los 7 días el control tiene un contenido en amonio muy inferior al resto de tratamientos. A las 24 horas, la tendencia a acumularse amonio en las hojas es mayor al aumentar la dosis de Glufosinato, sin embargo a los 7 días esta tendencia se invierte.

En la siguiente figura se muestra la actividad GS y contenido en amonio en hojas a las 24 horas, 7 días y 15 días después de la aplicación del herbicida en el momento II (a los dos meses de crecimiento).

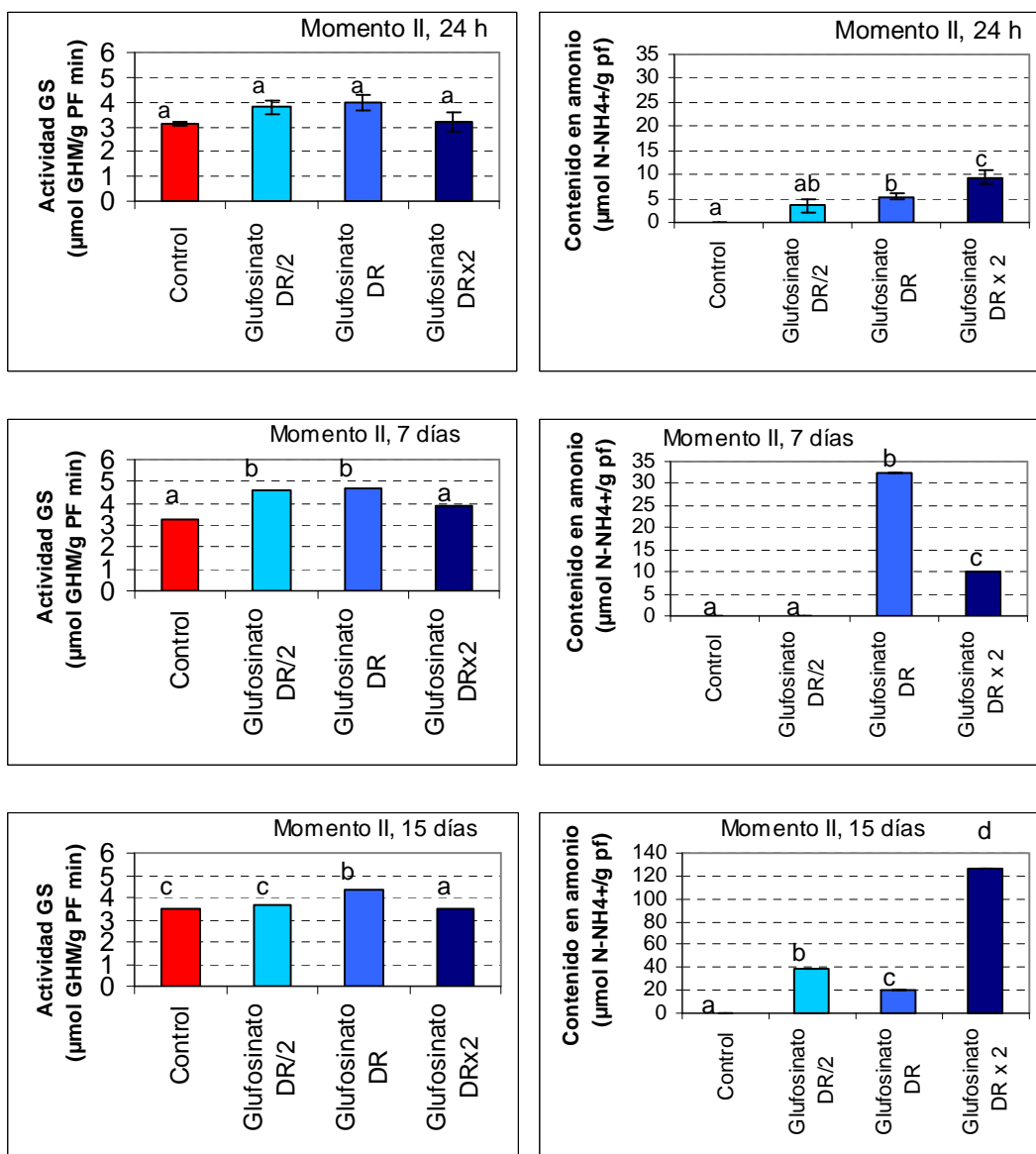


Figura 20: Actividad GS y contenido en amonio medidos en hojas a las 24 horas, 7 y 14 días de aplicación de las diferentes dosis de Glufosinato amónico a los dos meses de crecimiento. Los datos representan la media ± error estándar (n= 4).

Al analizar la figura 20, se observa que a las 24 horas después de la aplicación del herbicida la actividad GS no presenta diferencias significativas entre tratamientos. A los 7 días, el tratamiento control y el tratamiento de herbicida en la dosis DRx2 presentan una actividad GS inferior, en torno a un 20% respecto a los tratamientos de herbicida con dosis DR/2 y DR. A los 15 días, la actividad GS de las plantas con tratamiento de herbicida con la dosis DR es en torno a un 20% superior a los otros tratamientos. Respecto al contenido de amonio en hojas, a las 24 horas la tendencia es a incrementarse al aumentar la dosis de herbicida. A los 7 días, el contenido de amonio en hojas es significativamente superior en DR y DRx2, respecto a control y DR/2. A los 15 días, el contenido de amonio en hojas aumenta significativamente con la dosis de herbicida, siendo el incremento experimentado con la dosis DRx2 del orden de 5 veces superior a los contenidos detectados en otros momentos de muestreo y de dosis aplicadas.

En la siguiente figura se muestra la actividad GS y contenido en amonio en hojas a las 24 horas, 7 días y 15 días después de la aplicación del herbicida en el momento III (a los tres meses de crecimiento).

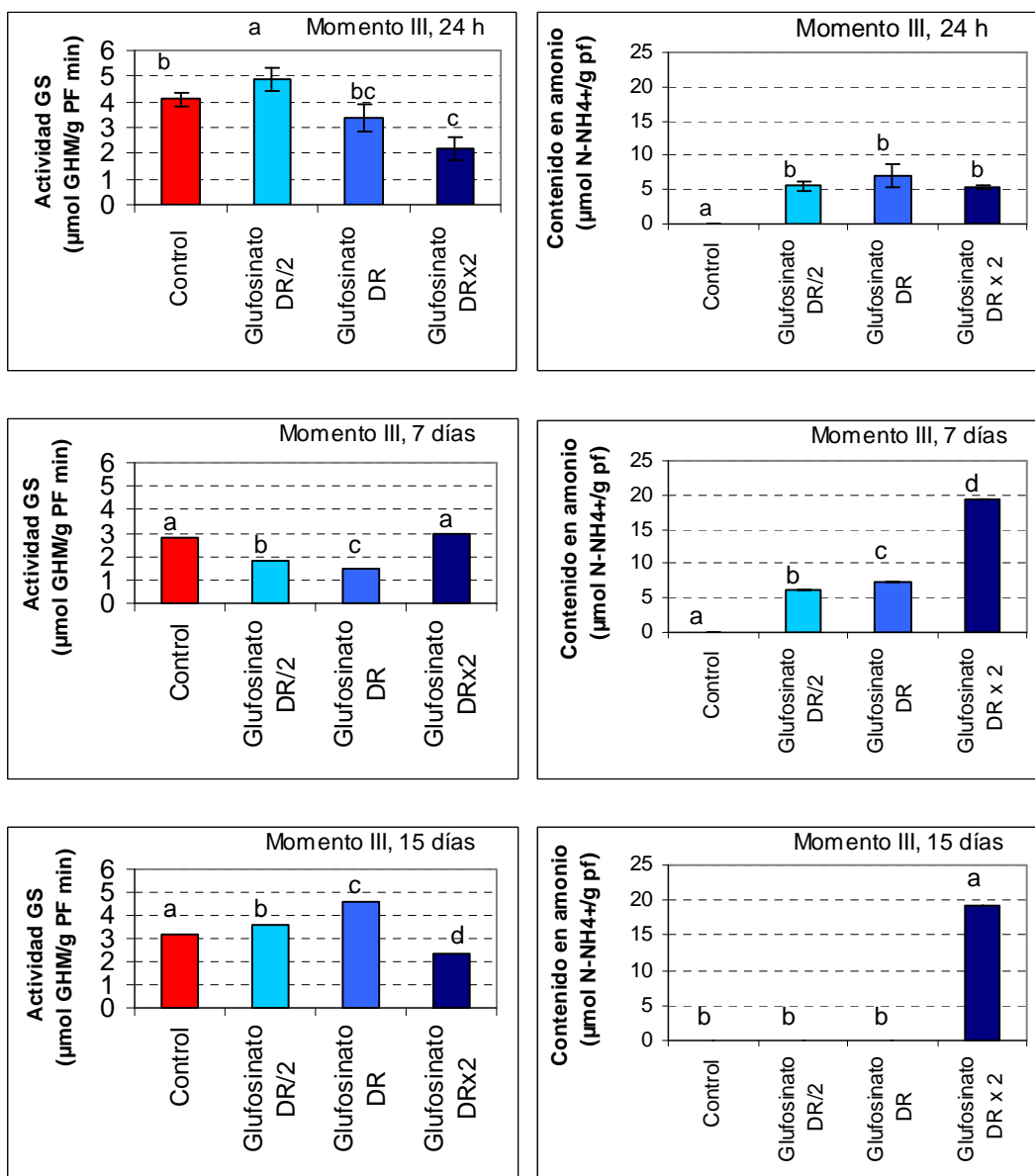


Figura 21: Actividad GS y contenido en amonio medidos en hojas a las 24 horas, 7 y 14 días de aplicación de las diferentes dosis de Glufosinato amónico a los tres meses de crecimiento. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).

Al analizar la figura 21 se observa que hay diferencias estadísticamente significativas respecto a la actividad GS a las 24 horas de la aplicación, siendo la máxima actividad GS en la DR/2. A los 7 días, la actividad GS disminuye su valor, especialmente en la DR/2 y la DR. El valor de actividad GS en la DRx2 se mantiene. Finalmente, a los 15 días, los valores de actividad GS aumentan tanto en el control, en la DR/2 y en la DR. En cambio, el valor de DRx2 disminuye ligeramente.

### 5.1.3 DATOS SPAD EN EL ENSAYO DE HERBICIDAS

El análisis de los datos del SPAD indica el cambio de color de las hojas sufrido por las plantas tras aplicarles el herbicida, tanto cambios hacia amarilleamiento como hacia colores de tejido necrótico. Se realiza la comparación de los tratamientos de herbicida respecto al control y se muestran si presentan diferencias significativas, ya que los amarilleamientos dan en general valores más bajos de SPAD mientras que las necrosis de plantas dan valores altos.

Tratamiento/Momento		Día 2	Día 4	Día 7	Día 15
Control					
Momento I	Glufosinato DR/2			**	**
	Glufosinato DR			**	**
	Glufosinato DRx2		**	**	**
Momento II	Glufosinato DR/2	**	**	**	
	Glufosinato DR	**	**	**	**
	Glufosinato DRx2	**	**	**	**
Momento III	Glufosinato DR/2				
	Glufosinato DR			**	
	Glufosinato DRx2		**	**	**
Oxifluorfen (Preemergencia)					
Momento I	Glifosato DR			**	**
Momento II	Glifosato DR			**	**
Momento III	Glifosato DR			**	**

Tabla 4: Análisis SPAD en herbicidas

En la tabla 4 se puede ver como cambia el contenido en clorofila respecto de las plantas control. De forma general, el efecto del herbicida se produce entre los 4 y los 7 días tras la aplicación, excepto la aplicación de Glufosinato en el momento II, que ocurre a los 2 días. En la aplicación del herbicida Oxifluorfen no hay diferencias significativas respecto de las plantas control.

## 5.2 ENSAYO DE FERTILIZACIÓN

Los tratamientos fertilizantes empleados en nuestro ensayo han sido dos dosis de N (60 y 120 kg de N en forma de  $\text{KNO}_3$  por hectárea) aportados en tres momentos diferentes (15 de Junio – 16 de Julio y 12 de Agosto), que equivalen a 1,2 y 3 meses tras la plantación.

Dentro de este ensayo, se han realizado medidas de crecimiento, análisis de delta de N, contenido en nitrógeno y actividad NR *in vivo* en el tercer mes de aplicación del nitrato,

### 5.2.1 MEDIDAS DE CRECIMIENTO

Los parámetros de crecimiento analizados han sido los mismos que en el ensayo de herbicidas, es decir, peso fresco de los tallos, relación peso fresco/peso seco de los tallos, área foliar e índice SLA.

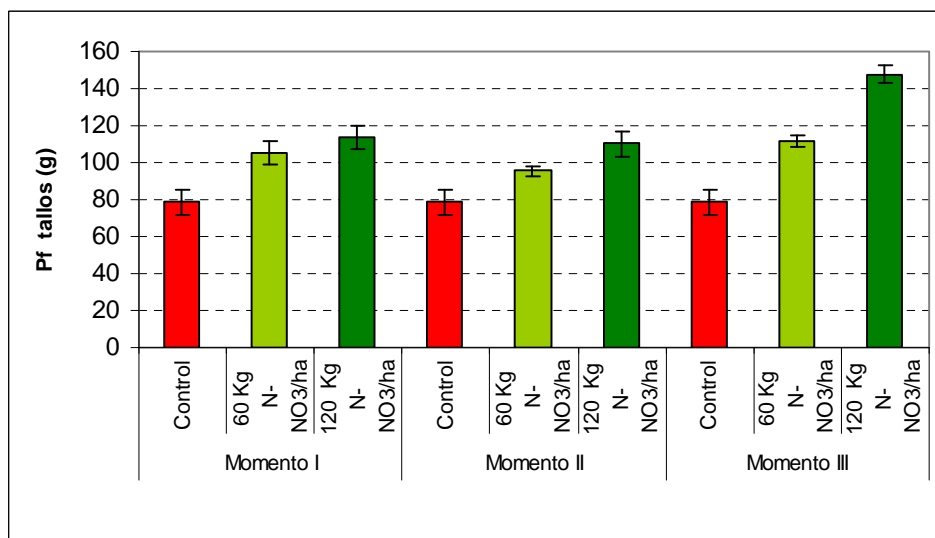


Figura 22: Peso fresco de tallos de las plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> aplicadas en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4).  
Ver anexo 1

La figura 22 muestra el peso fresco de los tallos de las plantas de chopo

fertilizadas con distintas dosis de N y aplicadas en diferentes momentos. Los datos muestran que no hay interacción entre las variables dosis y momento de aplicación pero si existen diferencias significativas para la variable dosis y para la variable momento de aplicación. La aplicación de N-NO<sub>3</sub> incrementa el peso fresco de los tallos, siendo los efectos más acentuados en el momento III.

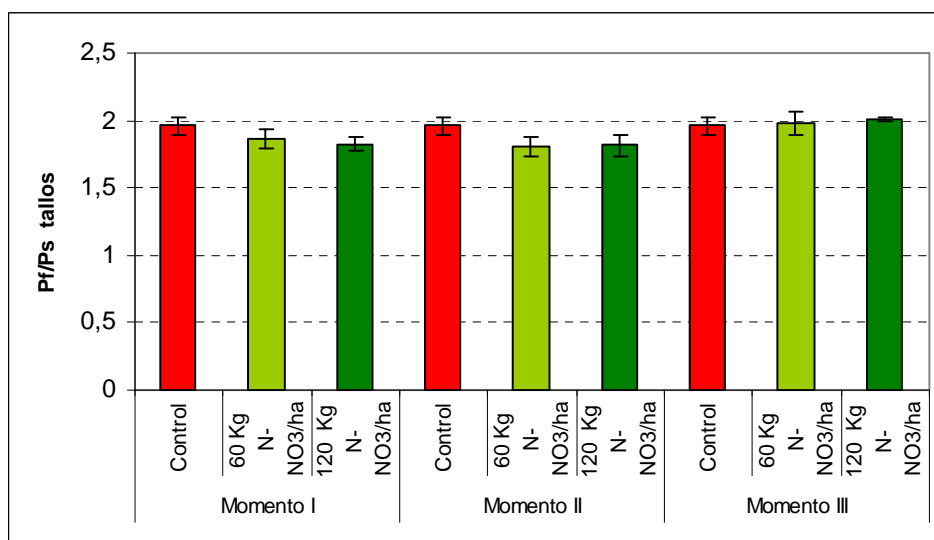


Figura 23: Relación entre el peso fresco y el peso seco de tallos de las plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media ± error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 23 muestra la relación entre el peso fresco y el peso seco de tallos de las plantas fertilizadas con distintas dosis de N en diferentes momentos. No se da una interacción significativa entre variables y no existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis de N, ni los distintos momentos de aplicación.



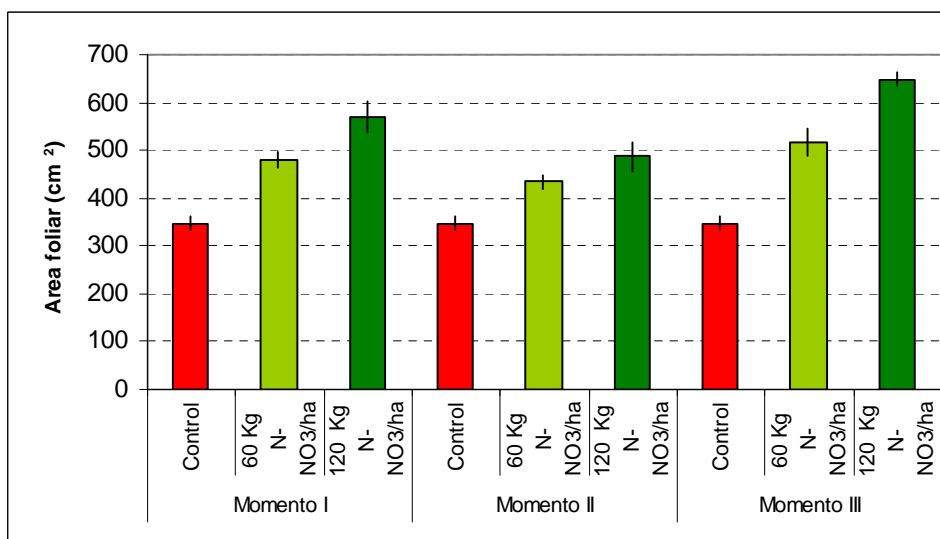


Figura 24: Área foliar de las plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 24 muestra el área foliar de tallos de las plantas fertilizadas con distintas dosis de N en diferentes momentos. No hay interacción significativa entre la variable dosis y el momento de aplicación. Sin embargo se observan diferencias significativas en la dosis de N y en el momento de aporte. Al aumentar la dosis de N aumenta el área foliar, siendo este aumento más destacado en el momento III.

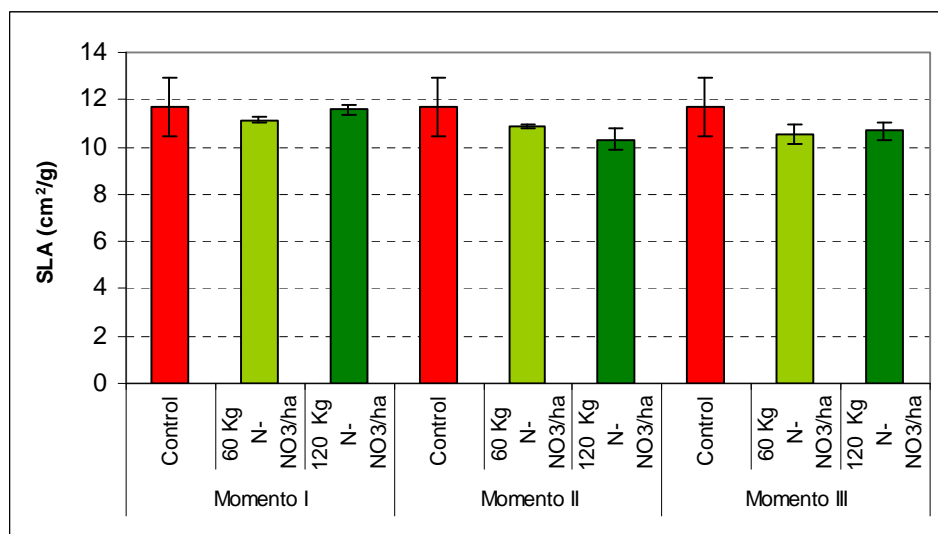


Figura 25: Índice SLA de las plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> aplicados en 3 momentos diferentes. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 25 muestra el índice SLA de las hojas de las plantas fertilizadas con distintas dosis de N en diferentes momentos. No existe una interacción significativa entre las variables dosis de N y momento de aplicación y no se dan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis y los distintos momentos de aplicación.

### 5.2.2 ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA *IN VIVO*

En las siguientes gráficas se muestra la actividad Nitrato reductasa medida 7 días después tras la aplicación de fertilizante en el momento III (a los 3 meses tras plantación).

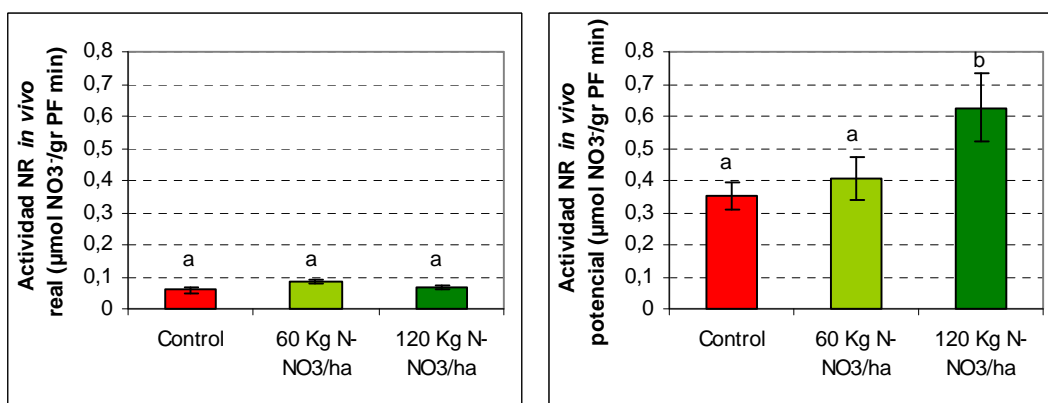


Figura 26: Actividad NR real y potencial de plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub>, medidas 7 días después de la aplicación de N-NO<sub>3</sub> en el momento III. Los datos representan la media ± error estándar (n= 4).

La figura 26 muestra la actividad nitrato reductasa real y potencial en hojas de las plantas fertilizadas con distintas dosis de N en el momento de aplicación III, a los tres meses tras la plantación. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la actividad nitrato reductasa real. La actividad nitrato reductasa *in vivo* real del control es similar al de los tratamientos de fertilización. En cambio, si se dan diferencias estadísticamente significativas en la actividad NR *in vivo* potencial. Se forman dos grupos diferenciados, por un lado el control y la dosis de 60 kg N-NO<sub>3</sub>/ha y por otro la dosis de 120 kg N-NO<sub>3</sub>/ha.

### 5.2.3 DATOS SPAD DE FERTILIZANTES

En la siguiente tabla se muestran los datos del contenido en clorofila tras la aplicación de fertilizante respecto de plantas control. En este caso, la aplicación de fertilizante hace que las plantas tengan una coloración verde más intensa.

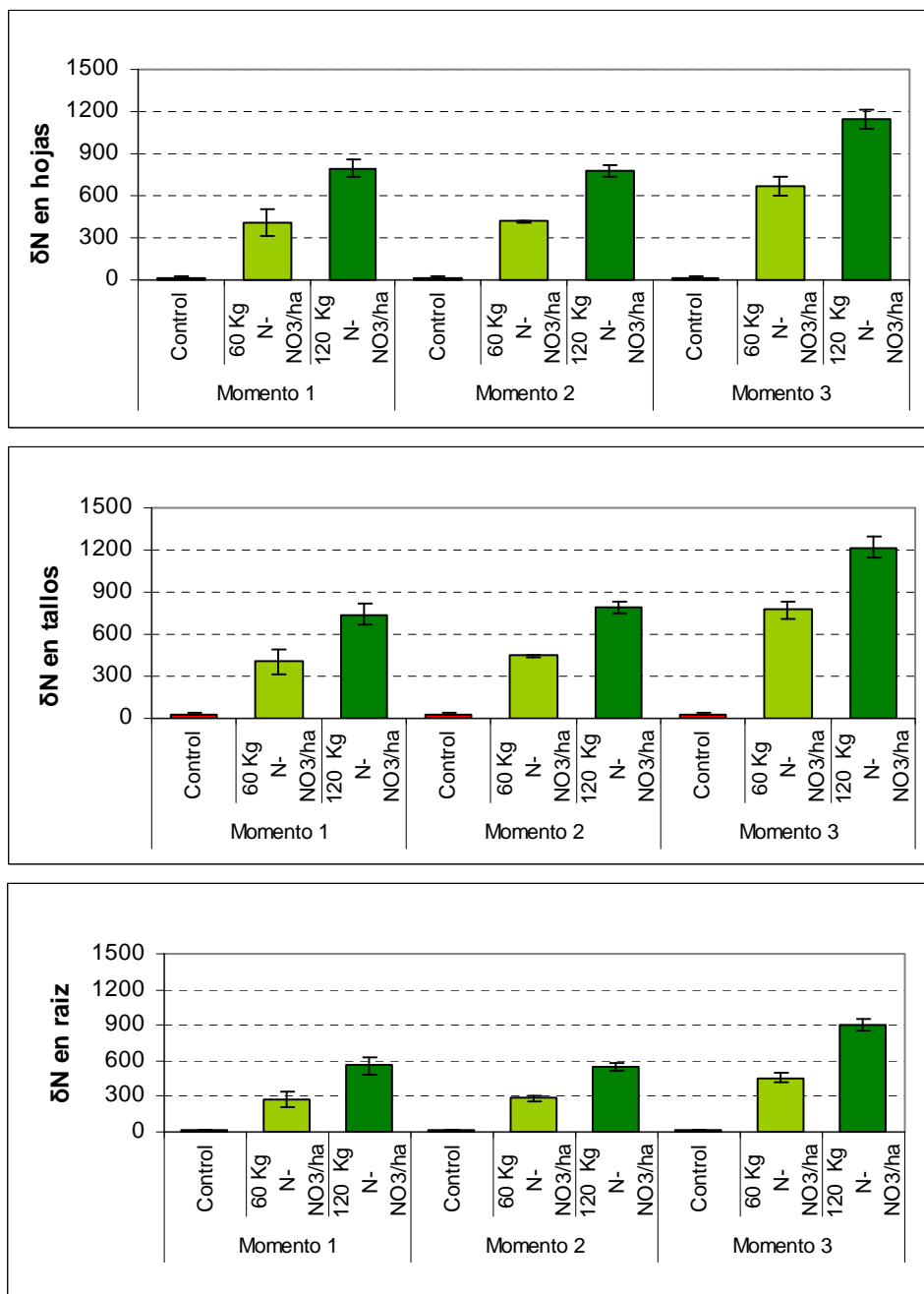
Tratamiento/Momento		Día 2	Día 4	Día 7	Día 15
Control					
Momento I	60kg/ha			**	**
	120 kg/ha		**		**
Momento II	60kg/ha	**	**		
	120 kg/ha	**	**	**	**
Momento III	60kg/ha		**	**	**
	120 kg/ha	**	**	**	**

Tabla 5: SPAD en plantas fertilizadas

Como se ve en la tabla 5, hay diferencias significativas en datos de SPAD en todos los casos, produciéndose, de forma general cambios en la pigmentación de las plantas entre los 2 y los 4 días después de la aplicación, aunque hay tratamientos en los que el cambio de pigmentación se produce antes de los 2 días.

### 5.2.4 ANÁLISIS DE DELTAS DE NITRÓGENO

Se muestran los datos de deltas de nitrógeno en hojas, tallos y raíz de plantas tratadas con dos dosis de fertilizante.



Figuras 27: Contenido en deltas de nitrógeno al 1 % de nitrógeno marcado de plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> marcado con <sup>15</sup>N al 1%. Los datos representan la media ± error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 27 representa respectivamente el contenido en delta de N de hojas, tallos y raíz para los distintos tratamientos de fertilización. Los datos muestran que no hay interacción significativa entre dosis de N y momento de aplicación, pero hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis y los distintos momentos. En la figura vemos que en los momentos I y II se incrementa el delta de N con la dosis de N aportada y este incremento es similar en ambos momentos. En el momento III el incremento del delta con la dosis de N es significativamente mayor que en los otros momentos de aplicación.

### 5.2.5 PORCENTAJE DE NITRÓGENO MARCADO

Con los datos del  $\delta$  se calcula porcentaje de  $^{15}\text{N}$  incorporada en hojas, tallo y raíz de cada planta del ensayo. Se pretende estudiar el aprovechamiento por parte de las plantas del nitrógeno aportado en la fertilización, ya que el N aportado en la fertilización estaba marcado con  $^{15}\text{N}$  al 1%.

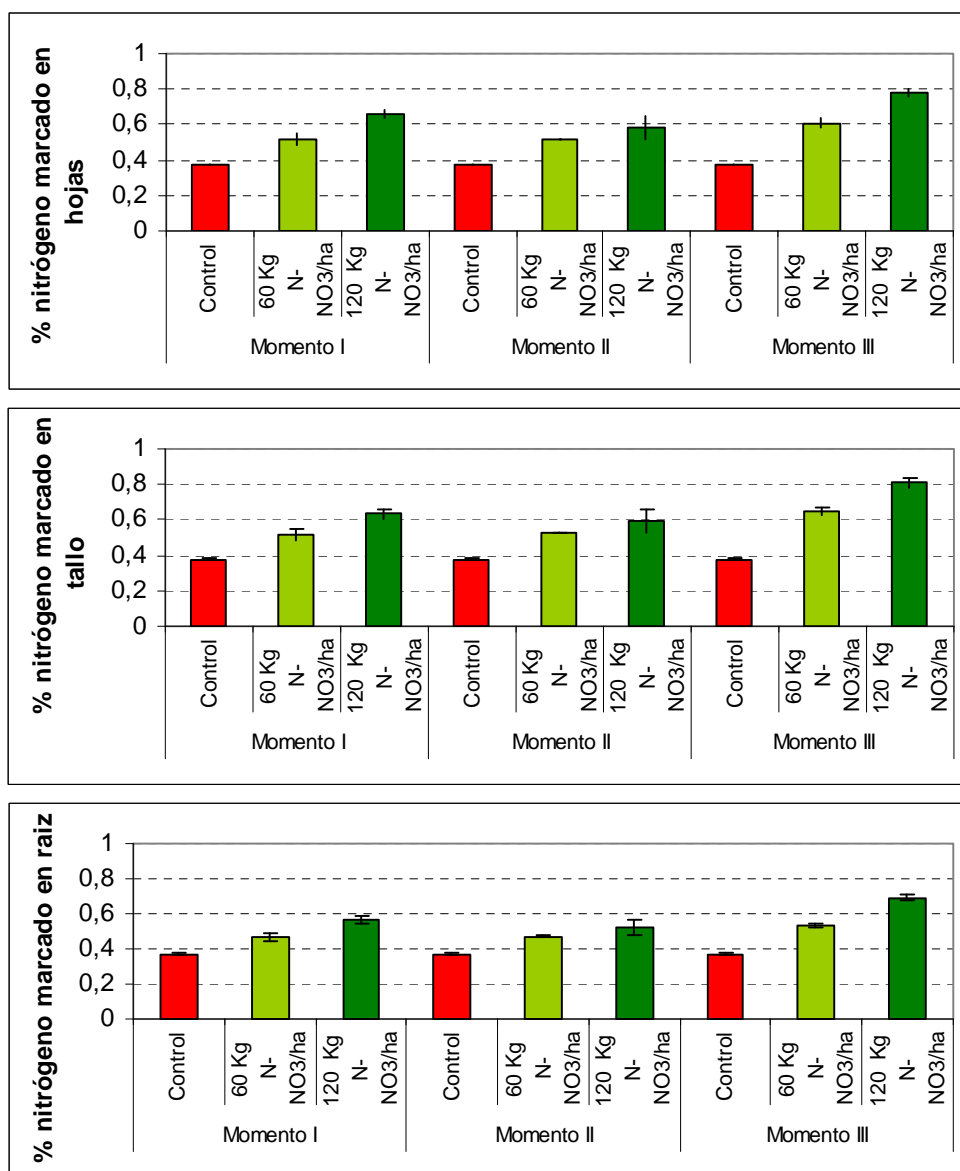


Figura 28: Porcentaje de nitrógeno marcado en hojas, raíz y tallo de plantas crecidas con distintas dosis de N-NO<sub>3</sub> marcado con  $^{15}\text{N}$  al 1%. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (n= 4). Ver anexo 1

La figura 28 representa respectivamente el contenido en nitrógeno marcado  $^{15}\text{N}$  en hojas, tallos y raíz para los distintos tratamientos nitrogenados. Los datos muestran que no hay interacción significativa entre dosis de N y momento de aplicación, pero hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis y los distintos momentos. En el momento III el contenido con la dosis de  $^{15}\text{N}$  es significativamente mayor que en los otros momentos de aplicación para todas las partes de la planta. Además, en todos los casos observamos un aumento significativo en este parámetro con respecto de la dosis para todas las partes de la planta.



## 6. DISCUSIÓN



## **EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA DE *POPULUS SP.* A DISTINTOS HERBICIDAS**

El control de las malas hierbas en las primeras fases del cultivo de chopo en ciclo corto y alta densidad es el período más crítico del cultivo (Douglas y col., 1997). Se han observado pérdidas de producción en el primer año tras plantación de entre un 50% y un 95% por competencia con malas hierbas (Sage, 1999). Estos problemas de implantación del cultivo por competencia directa con las malas hierbas se han podido observar en otros ensayos llevados a cabo en parcelas en regadío en la ribera del Ebro por mismo grupo de investigación de Fisiología Vegetal de la UPNA. Sus consecuencias fueron devastadoras: pérdida total del primer año del cultivo en las parcelas más afectadas y nuevo replanteo del ensayo al siguiente año.

### **Evaluación de la tolerancia de *Populus sp.* al herbicida de pre-emergencia Oxifluorfen**

Debido a su efecto residual, se ha estudiado el efecto del herbicida de preemergencia Oxifluorfen sobre *Populus sp.* en el suelo ya que está descrito que tiene una permanencia en campo entre 3 y 6 meses (Sixto y col., 2007). En la aplicación del herbicida de preemergencia Oxifluorfen sobre el cultivo no se han observado diferencias significativas respecto al control en los parámetros de peso fresco, relación peso fresco/peso seco, área foliar ni SLA. No se han observado síntomas cloróticos como han observado otros autores (Sixto y col., 2000; Sixto y col., 2003) con aplicaciones sucesivas de este herbicida dado que en nuestro ensayo el herbicida se aplicó antes del estaquillado.

La utilización del herbicida Oxifluorfen es hoy un tratamiento indispensable para el control de malas hierbas en las parcelas. Su amplio abanico de control de malas hierbas (Sixto y col., 2000), las dosis de aplicación conocidas (Glichrinst C., 1989) y una fitotoxicidad baja (Sixto y col., 2000) hacen del Oxifluorfen una potente herramienta para el control de de malas hierbas en el primer año del cultivo de chopo en ciclo corto y alta densidad.

### Evaluación de la tolerancia de *Populus sp.* en el primer año a los herbicidas de post-emergencia Glufosinato amónico y Glifosato.

Las materias activas herbicidas no selectivas autorizadas en España para el *Populus sp.* solo incluyen al Glufosinato amónico y al Glifosato. El presente estudio pretende conocer la tolerancia del clon de *Populus sp.* I-214 a estos dos herbicidas no selectivos.

La aplicación de herbicidas residuales resulta una forma eficiente para combatir la presencia de malas hierbas (García-Baudín y Montero, 1996). En comparación con otros métodos de control tales como el empleo de labores intercalares mecánicas, estos métodos no permiten la eliminación de la hierba en la zona cercana al árbol obligando a recurrir a una escarda manual, incrementando exponencialmente los costes. La bibliografía referente a este tema matiza que los tratamientos han de hacerse de una manera selectiva, con campana o mochila y prestando especial cuidado en no dañar la planta (Sixto y col., 2002; Willouhgy y Clay, 1996).

La utilización de herbicidas no selectivos en plantaciones de chopo en ciclo corto y alta densidad se realiza como medida singular, siempre y cuando no se pueda realizar el control de las malas hierbas con Oxifluorfen. Su alto coste y los probables efectos adversos en las planta de chopo hacen de ella una operación de riesgo. Se debe tener siempre en cuenta que la viabilidad del cultivo energético depende de recibir la menor cantidad de inputs, tratando así de asegurar su rentabilidad.

### Evaluación de la tolerancia de *Populus sp.* a Glufosinato amónico.

La forma de actuación del Glufosinato amónico es inhibiendo irreversiblemente la enzima glutamina sintetasa, conduciendo a una gran disminución en los aminoácidos glutamina, glutamato, aspartato, serina, glicina y alanina. Debido a la falta de glutamato y serina, la transaminación de glioxilato en glicina en el curso de la fotorrespiración no puede tener lugar (Wendler y col., 1992). Se trata de un herbicida que puede translocarse a niveles muy bajos solo dentro de la hoja, por lo que la dosis de aplicación es importante.

En el ensayo se estudiaron la tolerancia de la planta de *Populus sp.* a 3 dosis diferentes: la dosis recomendada de 5l/ha, la mitad de la dosis y el doble de la dosis recomendada. Se decidió esta dosis como la recomendada porque es la menor que controla el amplio abanico de malas hierbas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se trabajó con las otras dos dosis tratando de pensar con criterios agronómicos y situaciones que pueden darse en campo: la dosis mitad de la recomendada es una “dosis de deriva”, que podía darse por un mala aplicación del herbicida con la campana, y la dosis doble pensando que podría ser una mala aplicación del herbicida por una pasada doble por la planta o ante una situación de grave infestación de malas hierbas. Tanto la recomendada como la doble serían si el herbicida se aplicara mecánicamente o incorporada con el agua de riego, que serían métodos más económicos y viables que la aplicación manual con campana.

Se han observado diferencias significativas respecto al control en los parámetros de peso fresco, área foliar y SLA para las tres dosis planteadas en los tres momentos de aplicación. El momento de aplicación parece determinante de la producción final ya que en la primera aplicación, al mes de realizar la plantación la tasa de mortalidad es del 85% independiente de la dosis. Conforme avanza el estadio de las plantas, la DR y DR/2 no producen marras, sino solamente clorosis y necrosis en la superficie de las hojas presentes en el momento de aplicación con posterior caída de las más afectadas. El segundo momento de aplicación, a los 2 meses tras la plantación no reporta diferencias significativas en la DR/2 y DR respecto al control; a pesar de ser generalizada la clorosis de las hojas en las 24-72 horas siguientes al tratamiento, la planta es capaz de recuperar una producción similar a las plantas control al final del ensayo. Las plantas tratadas DRx2 desarrollan clorosis, necrosis y mueren. En otros estudios encuentran resultados similares con aplicación de dosis altas de fosfinotricina (Pascual y col., 2007), un biocompuesto de acción semejante al Glufosinato amónico. Si bien en el tercer momento de aplicación, a los 3 meses tras la plantación, no quedó tan patente esa recuperación para alcanzar el desarrollo de las plantas control, quizá debida al menor tiempo de recuperación desde la aplicación a la recolección y a un crecimiento más limitado por el espacio de la maceta, si se observa una correlación positiva entre una mayor dosis aplicada y un menor crecimiento.

La actividad de la enzima GS, diana del herbicida Glufosinato amónico y la acumulación de amonio en hojas fueron determinados a las 24 horas, 7 días y 14 días tras la aplicación de los tratamientos. Se han podido observar diferencias significativas respecto al control en la actividad GS y en la acumulación de amonio en las hojas en los diferentes momentos de aplicación del Glufosinato amónico. Sin embargo los resultados no se revelan tan claros como se esperaba probablemente debido a que la acción inhibidora del herbicida sobre esta enzima clave en el metabolismo de los aminoácidos ocurre de forma irreversible entre las 24 horas y los 7 días tras aplicación, periodo en el cual no tenemos datos. La actividad GS se ve muy afectada después de una aplicación de Glufosinato amónico en el primer mes de crecimiento independientemente de la dosis utilizada, apareciendo esta inhibición de forma rápida (primeras 24h tras aplicación) y de forma estable en el tiempo. La actividad GS se ve menos afectada por la acción herbicida a partir del segundo mes de crecimiento. La relación entre los altos niveles de amonio en hoja y baja actividad GS puede ser debido a que en su composición el Glufosinato lleva amonio, con lo que la variabilidad del contenido de amonio encontrada puede ser debida a que no podemos determinar si el  $\text{NH}_4^+$  proviene del propio Glufosinato o de su acumulación por inhibición de la actividad GS.

La aplicación de Glufosinato amónico sobre la planta de chopo ha dejado patente la aparición y desarrollo de hojas desde los meristemos axilares, no observándose estos meristemos en las planta control. Este desarrollo es una herramienta de la planta contra el estrés producido por el herbicida que le permite continuar produciendo fotoasimilados y sobrevivir. Se ha constatado también que el desarrollo de estas hojas jóvenes de los meristemos axilares solo aparecen en la parte de la planta afectada por el herbicida; el desarrollo de los pisos superiores en la planta continúan con un crecimiento normal, sin el desarrollo de estas hojas.

### Evaluación de la tolerancia de Populus sp. a Glifosato

El Glifosato es un herbicida que inhibe la 5-enolpyruvyl shikimato 3-synthasa, enzima responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Los efectos del Glifosato no son proporcionales a las concentraciones de este herbicida, sino que dependen de la naturaleza de los adyuvantes usados en la formulación, por ello se optó por establecer el estudio de la dosis recomendada únicamente ya que, según el prisma agronómico del trabajo correspondería a una aplicación de Glifosato a toda la parcela.

La aplicación de Glifosato produce marras en el primer momento de aplicación (al mes de la plantación) pero conforme avanza el cultivo en las siguientes aplicaciones no producen muertes de plantas. El resultado obtenido es corroborado en bibliografía donde se explica que las aplicaciones tempranas de Glifosato producen baja supervivencia (Clay y Dixon, 1996).

Se han observado diferencias significativas respecto al control en peso fresco, área foliar y SLA. En el primer momento de aplicación, al mes de realizar la plantación, el crecimiento es mucho menor que en el resto de momentos, donde se observa un crecimiento similar. Estos resultados corresponden con el modo de acción del Glifosato que provoca o la muerte o una detención del crecimiento que conlleva un desarrollo anormal de la planta. Los resultados de los parámetros foliares observados son debidos al desarrollo anormal de la planta, el cual hemos constatado que influye variando en la estructura, tamaño y número de hojas, resultando amorfas, más cloróticas, pequeñas y generando un gran número de ellas.

## **ESTUDIO DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN *POPULUS SP.***

Dentro de una plantación de chopo en corta rotación y alta densidad, la fertilización supone uno de los costes más importantes, llegando hasta porcentajes del 27% de los costes de la plantación (Manzone y col., 2009). Por ello, es conveniente ajustar la dosis mínima que ofrezca las mayores producciones tratando así de utilizar los insumos de una manera eficiente.

El hecho de realizar la operación de fertilización depende de muchos factores, entre ellos de los cultivos precedentes, especialmente si han sido herbáceos ya que es posible encontrar exceso de abonado. Por otra parte, el desarrollo de las raíces de las plantas durante el primer año no es lo suficientemente grande y la aplicación de abono puede favorecer el desarrollo y vigor de las malas hierbas perjudicando indirectamente la fertilización al cultivo.

En la bibliografía referente al tema existe controversia entre fertilizar y no hacerlo. Se pueden encontrar experiencias que aconsejan la fertilización (Van den Driessche, 2008; Coleman y col., 2006) y otras que la desaconsejan (Hofmann-Shielle y col., 1999; Heilman y col., 1994; Kopp y Abrahamsom, 2001; Jug y col., 1999). Lo que parece claro en cualquier caso es que las diferentes condiciones edafoclimáticas, la presencia de semillas de malas hierbas en el terreno, el material clonal utilizado, los regímenes de riego, serán factores a tener en cuenta para evaluar la respuesta del cultivo a la fertilización. Incrementar la producción de biomasa con la fertilización es uno de los retos que debe superar los cultivos de chopo en corta rotación y alta densidad (Tuskan G., 1998).

En el ensayo de fertilización se han utilizado dos dosis diferentes, de 60 kg N/ha y de 120 kg N/ha. Estas recomendaciones de aportes de nitrógeno están extraídas de la bibliografía y algunos autores estiman que debe ser en torno a 60 kg N/ha (Jug y col., 1999) y entre 112 y 168 kg N/ha (Hansen y col., 1988).

Se han encontrado diferencias significativas en peso fresco y área foliar, y no en la relación peso fresco/peso seco de tallos ni SLA. La aplicación de N-NO<sub>3</sub> incrementa el



peso fresco de los tallos, siendo los efectos más acentuados en el momento III, cuando esta se aplica a los 3 meses tras la plantación, con unas diferencias en peso fresco de tallos del 85% con la dosis de 120 kg N/ha y del 40% con la dosis de 60 kg N respecto al control. En el momento II, a los dos meses tras la plantación, las diferencias en peso fresco son del 40 % para la dosis de 120 kg N/ha y del 20 % para la dosis de 60 kg N/ha respecto del control. Por último, la aplicación al mes de plantación produce unos incrementos de peso fresco del 40 y del 30 % respectivamente.

Al aumentar la dosis de nitrógeno aumenta el área foliar, siendo este aumento más destacado en el momento III, con unos incrementos del 85% con la dosis alta y del 45% con la dosis baja respecto al control.

El nitrato que es absorbido por la raíz puede ser reducido y asimilado en la propia raíz o ser transportado a la parte aérea de la planta, donde es asimilado. Las proporciones que se asimilan en la raíz o en las hojas dependen tanto de factores externos como de factores internos de la planta. En nuestro ensayo, la actividad nitrato reductasa, enzima de asimilación del nitrato, se ha medido en las hojas, ya que está descrita una actividad mayoritaria en este órgano en plantas de chopo (Black y col., 2002).

El efecto de la adición de  $\text{NO}_3^-$  en las plantas produce en las mismas un notable incremento de la actividad nitrato reductasa. Ésta es una enzima inducible por  $\text{NO}_3^-$ , aunque en algunas especies se observan unos bajos niveles constitutivos. Tras la adición de  $\text{NO}_3^-$  se produce un rápido aumento de la cantidad de mRNA de la nitrato reductasa como resultado de la activación de la transcripción del gen. Además, el  $\text{NO}_3^-$  también ejerce un control positivo postranscripcional incrementando la estabilidad de los mRNA y de las proteínas enzimáticas sintetizadas “de novo”. Otros factores como la luz y la disponibilidad de carbohidratos pueden regular la actividad de la nitrato reductasa a nivel postranscripcional (Taiz y Zeiger, 1998).

En nuestro ensayo no se observó una activación de la actividad nitrato reductasa en plantas crecidas con nitrato cuando esta actividad está determinada *in vivo* sin nitrato. Por lo que parece que no se ha inducido la síntesis de nitrato reductasa cuando se ha fertilizado con nitrato. Sin embargo, la actividad nitrato reductasa *in vivo* determinada con

nitrito en el medio de reacción es mayor cuanto mayor fue la dosis de fertilizante aplicado en las macetas. Por lo que otros factores pueden estar limitando la actividad real de esta enzima.

Por otro lado, se han encontrado diferencias significativas en dosis y momentos de aplicación del N para los deltas del nitrógeno y el porcentaje de nitrógeno marcado tanto en hojas, como en tallo y raíz. El momento I y II tienen semejante  $\delta N$ . En el momento III el delta del nitrógeno es significativamente superior a los otros momentos de aplicación.

Al analizar todos estos parámetros se observa que el desarrollo de las plantas es mayor cuanto más tarde se aplica el fertilizante y cuanto mayor es la dosis. En este ensayo los parámetros más altos se dan en la aplicación en el momento III, a los 3 meses tras la plantación. Observando los distintos parámetros, vemos que la aplicación de la dosis de 60 kg N/ha a los 3 meses tras plantación produce resultados similares a la aplicación de 120 kg N/ha en los momentos I y II. Esto puede ser debido al desarrollo de las raíces, de forma que al aplicar más tarde el fertilizante este es más efectivo debido a que el desarrollo de las mismas es mucho mayor (Andreu y col., 2006; Melgar, 2007).

## 7. CONCLUSIONES



## **CONCLUSIONES RESPECTO A LA TOLERANCIA A HERBICIDAS DE *POPULUS SP.***

- Bajo nuestras condiciones de crecimiento, el herbicida que menos afecta al crecimiento del chopo es el Oxifluorfen, teniendo unos parámetros de crecimiento similares a los de las plantas control.
- El momento de aplicación así como la dosis de aplicación influyen de manera importante en el crecimiento del chopo. Aunque se aplique la mitad de la dosis recomendada o la dosis recomendada de Glufosinato amónico al mes de haber realizado la plantación, se produce la muerte de un gran porcentaje de las plantas, en este caso del 75 % de las plantas. Si se realiza la aplicación de la dosis doble a la recomendada se produce una mortandad total. Respecto a la aplicación de Glifosato, en la aplicación al mes de la plantación se produce un 50 % de marras.
- De forma general, otras aplicaciones de Glufosinato o Glifosato afectan de manera negativa al crecimiento del chopo. Antes de realizar un tratamiento herbicida es necesario evaluar la competencia entre la estacilla y las malas hierbas, para realizar o no dicho tratamiento.

## **CONCLUSIONES RESPECTO AL COMPORTAMIENTO DE *POPULUS SP.* ANTE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA**

- El momento de aplicación de la fertilización nitrogenada afecta a los parámetros de crecimiento. Bajo nuestras condiciones de crecimiento parece más beneficiosa la aplicación tardía, ya que así se produce el desarrollo de las raíces y el aprovechamiento del fertilizante es mayor. En aplicaciones a los tres meses de plantación se debería hacer balance económico que justifique la dosis aportada frente a la producción obtenida.
- Si se estima necesario en un cultivo de chopo para biomasa el ahorro de inputs, recomendaríamos una dosis de 60 kg N/ha aportada a los tres meses de la plantación frente a la de 120 kg N/ha con aportes más tempranos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA



**Andreu J., Beltrán J., Delgado I., Espada J.L., Gil M., Gutierrez M., Iguácel F., Isla R., Muñoz F., Orús F., Pérez M., Quílez D., Sin E., Yagüe M.R. (2006).** Fertilización nitrogenada. Guía de Actualización.

**Artese Ch., Schenone G. y Bartolelli V. (2002).** Proyecto Res & Rue Dissemination “Calderas de biomasa para sistemas de calefacción doméstica”. Apuntes de jornadas para biomasa. CENER 2009

**Black B.L., Fuchigami L.H., Coleman G.D. (2002).** Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar. *Tree physiology* 22: 717-724.

**Christeresson, L. (2006).** Biomass production of intensively grown poplars in the southernmost part of Sweden: Observations of characters, traits and growth potential. *Biomass and Bioenergy* 30: 497-508.

**Clay D.V., Dixon F.L. (1996).** Weed management in short-rotation energy coppice: selectivity of foliar-acting herbicides. *Aspects of Applied Biology* 44: 109-116.

**Ciria M.P. (2009).** El cultivo de chopo con fines energéticos. *Vida rural*. 287: 18-21.

**Coleman M., Tolsted D., Nichols T., Johnson W.D., Wene E.G., Houghtaling T. (2006).** Post-establishment fertilization of Minnesota hybrid poplar plantations. *Biomass and Bioenergy* 30: 740-749.

**Douglas D., Netzer D.A., Riemenschneider E., Hartzler R.G. (1998).** Weed Management in short rotation poplar and herbaceous perennial crops grown for biofuel production. *Biomass and Bioenergy* 14: 385-394.

**El Bassam, N. (1998).** Energy plant species. Their use and impact on environment and development. Edit. James & James Ltd, UK.



**Fernández J. (2008).** Agroenergética, un motor del desarrollo sostenible. *Vida rural*. 272: 17-21.

**García Baudin J.M., MONTERO G. (1996).** Control de malas hierbas en la reforestación de tierras agrícolas. *Vida Rural* 35: 54-56.

**Gilchrist A.N. (1989).** Optimum rates of oxifluorfen for different poplar and willow clones. *Proc.42nd N.Z. Weed and Pest Control*: 143-145.

**Hansen E.A., McLaughlin A.R., Pope P.E. (1988).** Biomass and nitrogen dynamics of hybrid poplar on two different soils: implications for fertilization strategy. *Canadian. Journal . Forestal. Research* 18: 223–230.

**Heilman, P. E., Ekuan, G. and Fogle, D.(1994).** First-order root development from cuttings of *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* hybrids. *Tree Physiology* 14: 911-920.

**Hofmann-Schiellea C., Juga A., Makeschinb F., Rehfuess K.E. (1999).** Short-rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable land in the Federal Republic of Germany. I. *Forest Ecology and Management* 121: 41-55.

**IDAE ó Instituto para el ahorro y diversificación energética (2007).** Ahorro, eficiencia energética y fertilización nitrogenada. Ministerio de Industria, turismo y comercio.

**Jug A., Hofmann-Schielle C., Makeschin F., Rehfuess K.E. (1999).** Short-rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable in the Fedral Replublic of Germany II. Nutritional Status and bioelemenst export by harvested shoot axen. *Forest Ecology and Managements* 121: 67-83.

**Kopp R.F., Abrahamson L. P. (2001).** Willow biomass production during ten successive annual harvests. *Biomass and Bioenergy* 20: 1-7.

**Lasa B., Lamsfus C., Aparicio-Tejo P.M., Irigoien I. (2010).** Interaction between agriculture and the environment. *Agricultural Sciences: Topics in Modern Agriculture*. Studium Press, LLC. Houston, USA.

**Manzone M., Airoidi G., Balsari P. (2009).** Energetic and economic evaluation of a poplar cultivation for the biomass production in Italy. *Biomass and Bioenergy* 33: 1258-1264.

**Melgar R. (2007).** El Manejo del Riesgo de la Fertilización en Cereales

**Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2008).** Comisión Nacional del Chopo. Subdirección General de Estadística del MARM.

**Pascual M.B., Jing Z.P., Kirby E.G., Canovas F.M., Gallardo F. (2007).** Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinothricin. *Phytochemistry* 69: 382–389.

**Sage R.B. (1999).** Weed competition in willow coppice crops: the cause and extent of losses. R.B. The game Conservancy Trust, Hampshire SP6 1EF, UK. *Weed research*.

Sixto H., Grau J.M., García Baudin J.M. (2000). Assessment of the effect of broad-spectrum pre-emergence herbicides in poplar nurseries. *Crop Protection* 20 (2001) 121}126

**Sixto H., Grau J.M., García Baudin J.M. (2002).** Control de malas hierbas en viveros de chopo mediante la aplicación de herbicidas. *Investigaciones Agrarias: sistemas de recursos forestales*. Vol 11 (1), 2002

**Sixto H., Grau J.M., García Baudín J.M. (2003).** Response of "I-214" clone (Populus x euramericana) to oxyfluorfen. *Sistemas de recursos forestales*. Vol 11 (1), 2003

**Sixto H., Hernández M.J., Barrio M., Carrasco J., Cañellas I. (2007).** Plantaciones del género *Populus* para la producción de biomasa con fines energéticos: revisión. *Investigación Agraria: Sistemas y recursos Forestales*, 16(3) 277-294, 2007

**Taiz L., Zeiger E. (1998).** Assimilation of mineral nutrients. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. *Plant Physiology* Pp. 323-345.

**Turmo J. (2009)** Perspectivas y oportunidades en el sector bioenergético. Conferencia dentro del curso “La agricultura como fuente de energía” realizado en Milagro (Navarra).

**Tuskan G.A. (1998).** Short- rotation woody crop supply systems in the United States: What do we know and what do we need to know? *Biomass and Bioenergy* 14: 307-315.

**Van Den Driessche R., Barbara R.T., Kamelchuk D.P. (2008).** Effects of N, NP, and NPKS fertilizers applied to four-year old hybrid poplar plantations. *New Forests* 35: 221–233.

**Wendler C., Putzer A., Wild A. (1992).** Effect of glufosinate (Phosphinothricin) and inhibitors of photorespiration on photosynthesis and ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase activity. *Journal of plant physiology*.

**Willoughby I., Clay D.V., (1996).** Herbicides for Farm Woodlands and Short Rotation Coppice. Field Book 14. Forestry Commission.

**World Energy Agency (2006).** Matriz energética mundial. [www.iea.org](http://www.iea.org)

## OTROS ARTÍCULOS Y PÁGINAS WEBS CONSULTADAS:

**Asociación Italiana de Biomasa:** [www.itabia.it](http://www.itabia.it)

**Ciria, M. P. (2009).** “El chopo (*Populus spp*) como cultivo energético”. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Madrid). *Hoja divulgadora* nº 2131. 32 pp.

**Padro A. (2003).** Conferencia internacional sobre el futuro del cultivo del chopo

**Proyecto On cultivos (2009).** Cultivos energéticos. [www.oncultivos.es](http://www.oncultivos.es)

## **ANEXO DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE ANOVA DE DOS VÍAS**

Las parámetros analizados mediante el análisis ANOVA de doble vía han sido las medidas de crecimiento de los herbicidas Glufosinato amónico y Glifosato, los datos SPAD de herbicidas, las medidas de crecimiento del ensayo de fertilización, los datos SPAD de fertilizantes, el análisis de deltas de nitrógeno y el porcentaje de nitrógeno marcado.

Las variables analizadas para los herbicidas Glufosinato amónico y Glifosato han sido la interacción dosis y momento, dosis, momento, interacción entre herbicidas y momento de aplicación, momento, herbicida.

Las variables analizadas para el ensayo de fertilización han sido interacción dosis y momento, dosis, momento.

### **Simbología utilizada:**

Estadísticamente significativo  $p > 0,05$ ; símbolo \*

Estadísticamente no significativo  $< 0,05$ ; símbolo n.s.

### **Estadística figuras 7, 8, 9 y 10:**

Se muestra en primer lugar la interacción dosis x momento, dosis y momento.

	Dosis x Momento	Dosis	Momento
Peso fresco	*	n.s.	n.s.
pf/ps	n.s.	n.s.	*
Área foliar	*	n.s.	*
SLA	*	n.s.	n.s.

### **Estadística figuras 11, 12, 13, 14:**

	Herbicida x Momento	Herbicida	Momento
Peso fresco	n.s.	n.s.	*
pf/ps	n.s.	n.s.	*
Área foliar	*	n.s.	n.s.
SLA	n.s.	*	*

### Estadística figuras 22, 23, 24 y 25:

	Dosis x Momento	Dosis	Momento
Peso fresco	n.s.	*	*
pf/ps	n.s.	n.s.	n.s.
Área foliar	n.s.	*	*
SLA	n.s.	n.s.	n.s.

### Estadística figura 27 y 28:

	Dosis x Momento	Dosis	Momento
Delta N	n.s.	*	*
% <sup>15</sup> N	n.s.	*	*